

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*
**PHYTOCHIMIE COMPAREE DE LA SECTION COELANTHE ET
ETUDE DES COMPOSES XANTHONIQUES DANS LES FEUILLES
DE GENTIANA BAVARICA L.**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

KURT HOSTETTMANN

ingénieur chimiste diplômé
de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
Docteur ès sciences

Institut de chimie
de l'Université
Neuchâtel

Mars 1973

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*
PHYTOCHIMIE COMPAREE DE LA SECTION COELANTHE ET
ETUDE DES COMPOSES XANTHONIQUES DANS LES FEUILLES
DE *GENTIANA BAVARICA* L.**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

KURT HOSTETTMANN

ingénieur chimiste diplômé

de l'Université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de

Docteur ès sciences

Institut de chimie
de l'Université
Neuchâtel

Mars 1973

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana* :
Phytochimie comparée de la section *Coelanthæ* et
étude des composés xanthoniques dans les feuilles
de *Gentiana bavarica* L.

de M. Kurt Hostettmann

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

Faculté des sciences

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport de Messieurs les professeurs

A. Jacot-Guillarmod, R. Hegnauer (Leiden),

C. Favarger et R. Tabacchi

autorise l'impression de la présente thèse sans expri-
mer d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 24 avril 1973

Le doyen :

A. Jacot-Guillarmod
A. Jacot-Guillarmod

A mes parents

L'esprit scientifique, c'est aussi l'esprit d'accueil. On est accueillant devant le résultat des expériences: elles contiennent une part de vérité que nous ignorons encore et que nous allons peut-être découvrir si nous prêtons attention. Nous ne savons pas ce que nous allons trouver, mais nous en sommes heureux à l'avance. Si nous extrapolons cette attitude au reste de notre existence, nous garderons une bienveillance attentive devant tout ce qui nous entoure, les choses et les êtres, les hommes que nous rencontrerons et les événements que nous vivrons. C'est une attitude très positive qui rend heureux celui qui la possède et qui rend heureux ceux qu'il approche. C'est un élément d'intérêt pour le monde, pour son évolution, pour les frères hommes éloignés de nous, c'est une source de rayonnement.

Alors, notre existence se poursuivra dans une ambiance de constant progrès, de renouvellement, d'accueil au monde...

Louis Leprince-Ringuet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Le présent travail a été effectué de septembre 1969 à mars 1973 dans les laboratoires de Chimie organique de l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur André Jacot-Guillarmod, auquel nous exprimons toute notre reconnaissance du soutien précieux et des conseils qu'il nous a donnés tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier également Monsieur le Professeur Raphaël Tabacchi de son aide pour l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire, ainsi que Monsieur le Professeur Claude Favarger qui nous a conseillé dans le choix du matériel végétal.

Nous exprimons toute notre gratitude à ceux qui nous ont apporté leur collaboration, en particulier Melle Irène Ghilezan, MM. Jean-Michel Schwendimann, Michel Gütz et Luong Minh Duc.

Enfin, nous remercions la maison CIBA-GEIGY à Bâle de l'octroi d'une bourse d'études.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. UTILISATION DES COMPOSES FLAVONIQUES ET XANTHONIQUES EN PHYTOCHIMIE COMPAREE	1
2. GLUCIDES IDENTIFIES DANS LE GENRE GENTIANA	7
3. BUT DU PRESENT TRAVAIL	8
RECHERCHE ENTREPRISE	
4. IDENTIFICATION DES POLYPHENOLS DES FEUILLES DE GENTIANA LUTEA L.	11
4.1. Nouvelle méthode d'extraction des feuilles de <u>Gentiana lutea</u> L.	11
4.2. Isolement et identification de <u>A₁</u>	15
4.3. Isolement et identification de <u>E</u>	22
4.4. Isolement et contribution à l'identification de <u>F</u>	38
5. PHYTOCHIMIE COMPAREE DE LA SECTION COELANTHE	46
5.1. Précautions à prendre	46
5.2. Provenance du matériel végétal	48
5.3. Isolement des composés flavoniques	48
5.4. Analyse comparative du (+)-bornésitol	52
5.5. Analyse comparative de <u>F</u>	53
5.6. Analyse comparative de <u>E</u>	54
5.7. Analyse comparative de <u>D</u>	57
5.8. Analyse comparative de <u>C</u>	63
5.9. Analyse comparative de <u>B</u>	64
5.10. Analyse comparative de <u>G</u>	65
5.11. Résumé et conclusion	66

6. ETUDE DES COMPOSES XANTHONIQUES DANS LES FEUILLES DE GENTIANA BAVARICA L.	70
6.1. Isolement des composés	70
6.2. Identification de <u>D</u>	74
6.3. Identification de <u>C</u>	79
6.4. Identification de <u>B</u>	84
6.5. Identification de <u>A</u>	87
6.6. Identification de <u>J</u>	90
6.7. Identification de <u>I</u>	94
6.8. Identification de <u>H</u>	100
6.9. Identification de <u>G</u>	106
6.10. Identification de <u>F</u>	111
6.11. Identification de <u>E</u>	116
6.12. Relations entre les substances isolées	118
6.13. Résumé et conclusion	121
7. RESUME ET CONCLUSION	123
7.1. Composés isolés à partir de <u>Gentiana lutea</u>	123
7.2. Phytochimie comparée de la section <u>Coelanthé</u>	127
7.3. Composés isolés à partir de <u>Gentiana bavarica</u>	126
7.4. Conclusion	128
PARTIE EXPERIMENTALE	130
8. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	130
8.1. Chromatographie sur papier	130
8.2. Chromatographie sur couches minces	130
8.3. Chromatographie sur colonne	132

9. TECHNIQUES D'ANALYSE	134
9.1. Spectroscopie UV	134
9.2. Spectroscopie IR	134
9.3. Résonance magnétique nucléaire	134
9.4. Hydrolyses	135
9.5. Acétylation	136
9.6. Méthylation	136
9.7. Purification des produits d'hydrolyse ou de méthylation	137
BIBLIOGRAPHIE	138

I N T R O D U C T I O N

1. UTILISATION DES COMPOSES FLAVONIQUES ET XANTHONIQUES EN PHYTOCHIMIE COMPAREE

Le genre Gentiana, le plus vaste de la famille des Gentianacées (ordre des Contortae ou Gentianales), compte 450 à 600 espèces. Il offre de nombreuses variations morphologiques qui sont classées dans une vingtaine de sections environ.

Les études de taxonomie, qui ont largement recours aux critères cytologiques, sont rendues particulièrement difficiles par une ample série de nombres chromosomiques de base dans les différentes sections, par l'âge variable de celles-ci, et par le rôle important des phénomènes d'hybridation survenus au cours de l'évolution du genre.

De ce fait, les données cytologiques doivent être employées avec prudence et toujours en corrélation avec d'autres critères. L'un de ces critères est la phytochimie qui n'a été que très peu utilisée à des fins taxonomiques chez les Gentianacées.

Pour être utilisée en phytochimie comparée, une substance naturelle doit remplir certaines conditions [1] :

1. Elle ne doit pas être un constituant universel de la matière vivante. Par exemple, la présence de cellulose dans les organismes végétaux pourrait - sous certaines réserves - différencier plantes et animaux, mais ne présente pas d'intérêt à l'intérieur même des Angiospermes.
2. Inversement, elle ne doit pas avoir une structure trop complexe, ni se trouver dans un nombre trop restreint d'espèces, ce qui rendrait le regroupement d'espèces par affinités trop difficile.

3. Elle doit s'accumuler dans l'organisme et par conséquent intervenir de façon limitée dans le métabolisme.
4. Elle doit être facile à détecter.

Bien que leur rôle soit encore peu connu, les flavonoïdes ne semblent pas intervenir activement dans la physiologie des plantes. Ils présentent selon divers auteurs plusieurs caractères intéressants du point de vue taxonomique :

- pas de variations fondamentales selon l'âge et le milieu où se trouve la plante.
- présence très large dans les végétaux, et simultanément existence d'un très grand nombre de types différents.

Les flavonoïdes n'ont fait jusqu'ici l'objet d'aucune investigation systématique dans le genre Gentiana, si ce n'est le récent travail effectué à l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel (voir chap. 3). Les quelques rares représentants qui furent mentionnés avant ce travail sont groupés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Distribution des flavonoïdes dans le genre Gentiana

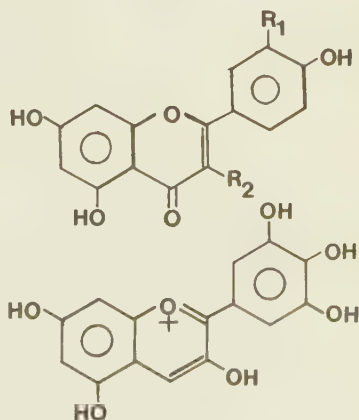
Espèces	Substances	Réf.
G. <u>makinoi</u> Kusn.	quercétine, kaempférol	[2][3]
G. <u>septemfida</u> Pall.	traces de kaempférol, glucosides de la delphinidine, lutéoline	[2][3] [4] [5]
G. <u>acaulis</u> L.	dérivé p-coumaroylé de delphinidine-3-glucoside	[4]
G. <u>cachemirica</u> Decne.	delphinidine-3-glucoside	[4]
G. <u>verna</u> L.	glucosides de la delphinidine	[4]
G. <u>campestris</u> L.	glucosides de la delphinidine	[4]

Kaempférol : $R_1 = H$, $R_2 = OH$

Quercétine : $R_1 = OH$, $R_2 = OH$

Lutéoline : $R_1 = OH$, $R_2 = H$

Delphinidine :



Les xanthones furent en revanche plus largement étudiées; elles constituent l'une des caractéristiques du genre et se trouvent dans les racines. La distribution des xanthones dans le genre Gentiana est reproduite dans le tableau 2. (voir également travail effectué à l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel, chapitre 2).

Tableau 2 : Distribution des xanthones dans
le genre Gentiana

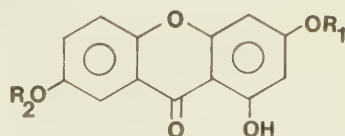
Espèces	Substances	Réf.
G. <u>lutea</u> L.	gentisine ¹⁾ ; idogentisine ; gentioside	[6]
	dihydroxy-1,3 diméthoxy-2,7 xanthone	[7]
	hydroxy-1 diméthoxy-3,7 xanthone	[8]
	triméthoxy-1,3,7 xanthone	[8]
	gentiséine	[8]
G. <u>acaulis</u> L.	gentiacauline ²⁾ (identique au gentiacauloside)	[9][10]
	gentiacauléine (aglycone du gentiacauloside)	[11]
	gentiacauloside (primevéroside de la gentiacauléine)	[11]
G. <u>kochiana</u> Perr. et Song.	gentiacauléine	[11][12]
	gentiacauloside	[11]
	décussatine	[12][13]
	gentiakochianine (aglycone du gentiakochianoside)	[12][13]
	gentiakochianoside (primevéroside de la gentiakochianine)	[12][13]
	isogentiacauloside (primevéroside de l'isogentiacauléine)	[12]

(suite du tableau p. 5)

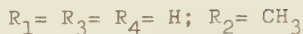
- 1) La gentisine a été également décelée dans deux hybrides de
G. lutea et G. purpurea : G. negetschweileri Ronn et
G. hybrida Schleich [15].
- 2) Le G. acaulis étudié par BRIDEL [9][10] était probablement
le G. kochiana, étant donné le lieu de récolte (col du
Lautaret, Hautes Alpes). [12].

(Suite du tableau 2)

G. <u>bellidifolia</u> Hook.	bellidifoline; isobellidifoline (identique au swertianol ?)	[14]
	5-O-méthylbellidifoline	[14]
	desméthylbellidifoline	[14]
	corymbiférine (4,5-di-O-méthylcorymbine)	[14]
	trihydroxy-1,3,8 diméthoxy-4,7 xanthone (4,7-di-O-méthylbellidine)	[14]
G. <u>verna</u> L.	décussatine	[15]
	primevérosyl-1 décussatine	[15]
G. <u>corymbifera</u> Kirk.	glycoside de la corymbiférine	[16]
G. <u>germanica</u> Willd.	gentialutéine	[2]

Gentiséine : $R_1 = R_2 = H$;Gentisine : $R_1 = CH_3$; $R_2 = H$ Isogentisine : $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$ Gentioside : $R_1 = \text{primevérosyle}$;
 $R_2 = CH_3$ 

Gentiakochianine :



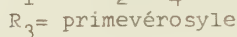
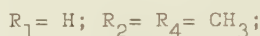
Gentiakochianoside :



Gentiacauléine :



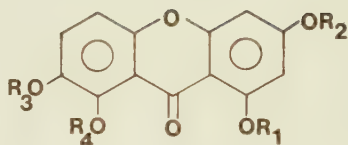
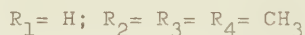
Gentiacauloside :



Isogentiacauloside :



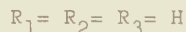
Décussatine :



Bellidifoline :



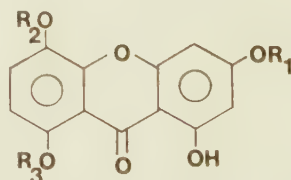
Desméthylbellidifoline:



5-O-Méthylbellidifoline:



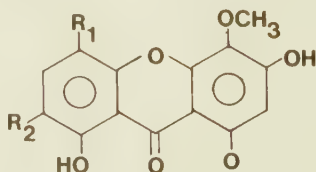
Isobellidifoline :



Corymbiférine :



4,7-Di-O-méthylbellididine:



2. GLUCIDES IDENTIFIES DANS LE GENRE GENTIANA

Les racines et les rhizomes des Gentianacées semblent contenir, à la place d'amidon comme substance de réserve, de l'inuline [17] et des pectines. Certaines espèces contiennent le trisaccharide gentianose et les disaccharides primevérose, gentiobiose et saccharose, en plus de monosaccharides plus courants : fructose, glucose [2][15].

Le gentianose semble avoir une certaine importance chimio-taxonomique pour la famille des Gentianacées (genre Gentiana et Swertia). FRANZ & MEIER [18] ont montré pour la première fois sa présence dans les feuilles de 13 espèces du genre Gentiana.

La présence de (+)-bornésitol dans des feuilles de Gentiana lutea L. a été démontrée pour la première fois par BELLMANN [19]. Il est fort possible que cette substance ait aussi une importance pour l'étude de phytochimie comparée que nous nous sommes proposé d'entreprendre.

3. BUT DU PRESENT TRAVAIL

Dans un récent travail consacré à la phytochimie du genre *Gentiana* effectué à l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel, BELLMANN [19] a étudié les composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles de *Gentiana lutea* L.

A partir de matériel sec, cet auteur a procédé à une extraction au chloroforme en vue d'éliminer les lipides et les chlorophylles. L'étude des constituants a été entreprise à partir d'un extrait méthanolique de ce matériel purifié.

Les constituants identifiés sont les suivants (voir fig.1) :

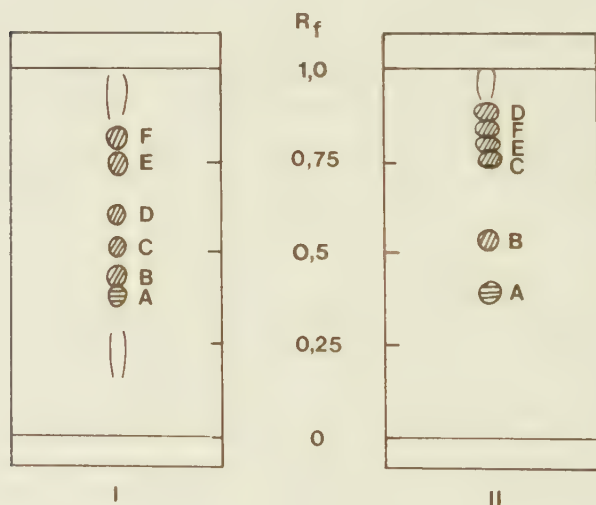


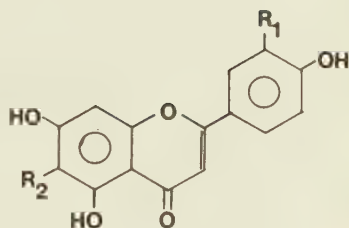
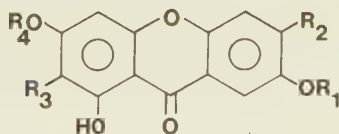
Fig.1 : Chromatogrammes d'extraits méthanoliques de *G. lutea* L.
 (phase stationnaire : polyamide Merck, solvant I :
 MeOH-H₂O (9:1), solvant II : C₆H₆-MeOH-AcOH
 (45:32:16), rév. UV 350 nm).

FlavonesB : isoorientine $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{C}-\beta\text{-D-glucopyranosyle}$ C : isovitexine $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{C}-\beta\text{-D-glucopyranosyle}$ E : lutéarine³⁾

O-glucoside de l'isoorientine

F : gentianarine³⁾

O-glucoside de l'isovitexine

XanthonesA : mangiférine $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{C}-\beta\text{-D-glucopyranosyle}$ $R_4 = \text{H}$ D : gentioside $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = R_3 = \text{H}$ $R_4 = \text{primevérosyle}$

3) noms provisoires donnés par BELLMANN

Relevons que cet auteur a isolé deux nouveaux composés flavoniques (E, F) dont la structure n'a pu être établie. Toutefois, les essais préliminaires laissaient supposer qu'il s'agissait de dérivés O-glucosidiques de deux C-glucosides flavoniques respectivement : l'isoorientine et l'isovitexine.

Enfin, mentionnons que BELLMANN a isolé en quantité appréciable du (+)-bornésitol, dont la présence n'avait jamais été mentionnée dans la famille des gentianacées.

Le présent travail avait pour objet, d'une part, de compléter l'étude mentionnée ci-dessus, notamment en appliquant d'autres méthodes d'extraction des feuilles de Gentiana lutea L. et, d'autre part, d'apporter d'autres précisions concernant la structure des deux composés non identifiés.

Par ailleurs, la connaissance de la nature des constituants flavoniques et xanthoniques dans cette espèce nous a paru suffisante pour entreprendre une étude de phytochimie comparée avec d'autres espèces. A cet effet, nous avons choisi la section Coelantle. Dans cette étude, nous avons inclus la recherche du (+)-bornésitol dont l'importance du point de vue taxonomique pourrait être grande.

Enfin, nous avons entrepris une étude de la constitution des composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles de Gentiana bavarica, en vue d'étendre nos critères de chimiotaxonomie à la section Cyclostigma.

R E C H E R C H E E N T R E P R I S E

4. IDENTIFICATION DES POLYPHENOLS DES FEUILLES DE GENTIANA LUTEA L.

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la méthode d'extraction de BELLMANN a présenté l'avantage de permettre l'isolement de 6 composés flavoniques et xanthoniques (voir fig.1). Toutefois, elle est sujette à certaines critiques du fait qu'un traitement préalable au chloroforme peut éliminer, en plus des lipides et des chlorophylles, des polyphénols peu polaires, notamment les dérivés méthoxylés des composés flavoniques et xanthoniques.

Dans cette optique, nous avons repris cette étude en examinant le contenu en polyphénols de l'extrait au chloroforme. Les essais préliminaires nous ont effectivement montré la présence d'une nouvelle substance. Dans le dessein de l'isoler et d'en établir la structure, nous avons adopté un nouveau système d'extraction.

4.1. Nouvelle méthode d'extraction des feuilles de Gentiana lutea L.

Nous avons retenu l'extraction à chaud, à partir de matériel séché⁴⁾, par des solvants de polarité croissante : ligroïne, éther, acétate d'éthyle, méthanol.

4) Les feuilles ont été séchées pendant 48 heures à l'étuve à 40°C.

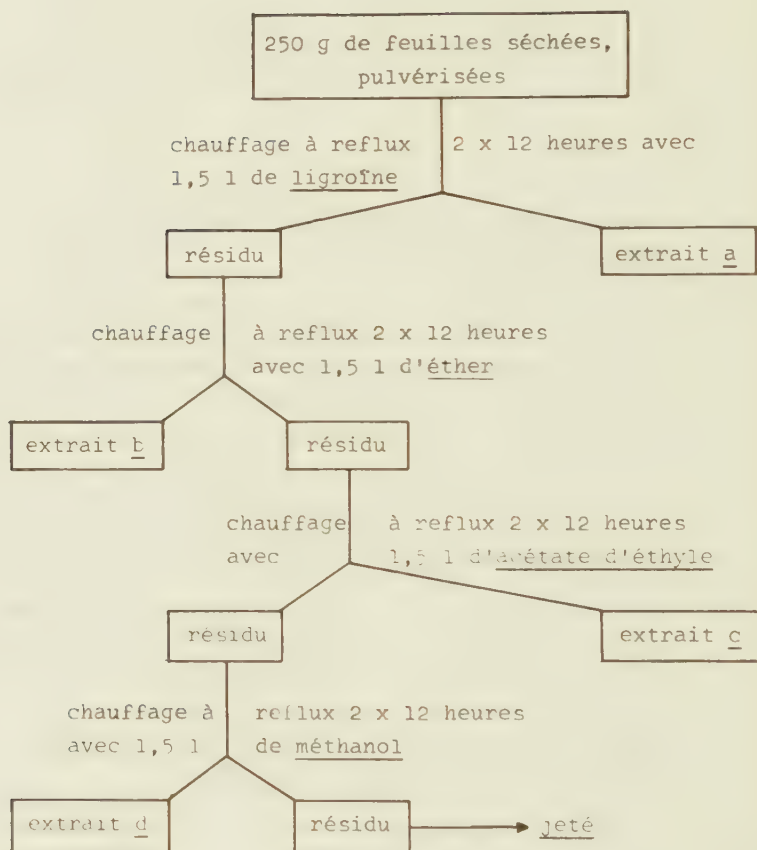


Fig. 2 : Schéma d'extraction

Les différents extraits ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie sur couche mince de polyamide Merck. Nous avons choisi comme éluant le système méthanol-eau (9:1) qui donne un aperçu général des polyphénols présents.

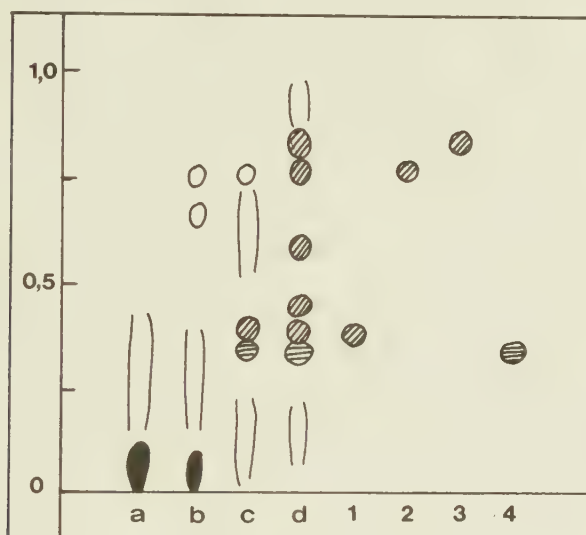


Fig. 3 : Représentation schématique du chromatogramme des différents extraits (phase stationnaire: polyamide Merck, phase mobile: méthanol-eau (9:1), révélation UV 350 nm).

● brun
● jaune

○ bleu clair
● rouge

- a) extrait ligroïnique
- b) extrait étheré
- c) extrait à l'acétate d'éthyle
- d) extrait méthanolique

- 1) isoorientine
- 2) lutéarine
- 3) gentianarine
- 4) mangiférine

L'extrait a est composé principalement de lipides, de chlorophylle, de carotènes, etc. Les extraits b et c contiennent beaucoup d'impuretés, d'apparence bleuâtre sous lumière UV, en particulier dans le domaine des valeurs R_f correspondant aux substances recherchées.

Les extraits a et b ont été soumis à une seconde analyse chromatographique sur couche mince de polyamide avec le système MeOH-ACOH-H₂O (90:5:5), qui permet une meilleure séparation des spots de R_f inférieurs.

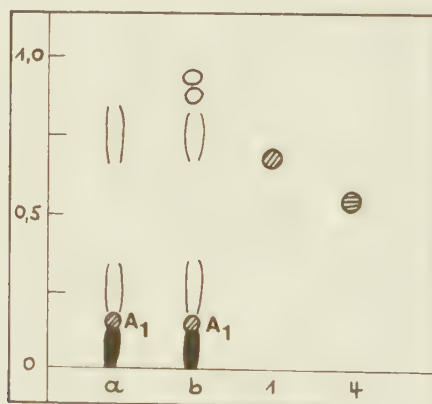


Fig. 4 : Chromatogramme des extraits ligroïnique et éthéré de Gentiana lutea sur polyamide Merck.

Eluant : MeOH-ACOH-H₂O (90:5:5). Rév.: UV 350 nm

- | | |
|------------------------|-----------------|
| a) extrait ligroïnique | 1) isoorientine |
| b) extrait éthéré | 4) mangiférine |

L'augmentation de la polarité du système de solvant employé fait apparaître une tache brune sous lumière UV. Ce spot A₁, masqué auparavant par la chlorophylle, est probablement de nature polyphénolique. La valeur R_f très faible (~ 0.18) nous fait penser à un aglycone flavonique ou xanthonique. Comme cette substance n'a pas été signalée par BELLMANN, nous avons entrepris de l'isoler par chromatographie préparative.

4.2. Isolement et identification de A₁

Les extraits ligroïnnique et éthéré (voir schéma d'extraction ci-dessus) réunis sont concentrés à 200 ml, puis additionnés d'eau chaude en vue d'éliminer une partie de la chlorophylle par précipitation. Le filtrat, évaporé à sec (~ 4 g), puis repris dans 20 ml de mélange MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5), est introduit sur une colonne de polyamide Macherey-Nagel SC 6 de diamètre $\approx 4,5$ cm et de longueur = 40 cm. L'élution est tout d'abord effectuée avec le même solvant; cependant, une augmentation de la polarité par addition d'acide acétique est nécessaire pour éluer la substance A₁.

L'éluat est recueilli par fractions de 10 ml à l'aide d'un collecteur de fractions automatique. Chaque fraction est examinée séparément par chromatographie sur couches minces. Après réunion des fractions identiques, évaporation du solvant et recristallisation dans l'éthanol, nous obtenons 60 mg de substance A₁ chromatographiquement pure⁵⁾.

Cristaux jaunes, très fins. F. : 245°C.

5) CCM polyamide Merck, solvant MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5). Rév.: 350 nm.

Le spectre UV dans le méthanol indique 4 maxima, dont le quatrième (370 nm) accuse l'absorbance la plus faible. Il s'agit d'un spectre caractéristique de xanthone [20].

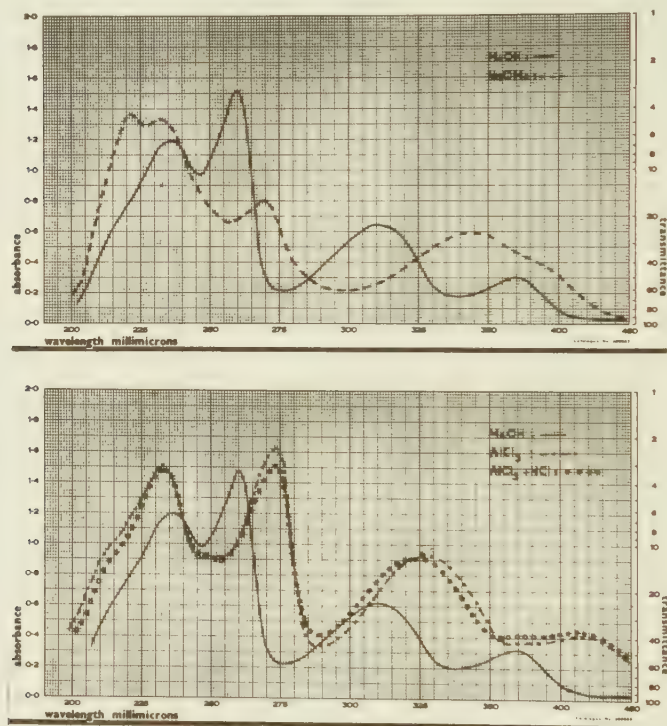


Fig. 5 : Spectres UV de A_1 dans le méthanol.

Tableau 3 : Maxima d'absorption du spectre UV de la substance A_1

Solvant	maxima [nm]			
MeOH	370	311	260	238
+NaOMe	345	270	233	
+AlCl ₃	415	327	274	233
+AlCl ₃ /HCl	413	324	274	233

L'addition de méthylate de sodium provoque un changement notable dans l'allure du spectre UV de la substance A_1 : apparition d'une bande intense vers 350 nm et d'une seule bande intermédiaire à 270 nm. Nous pouvons conclure à la présence d'un groupe hydroxyle en 3 (ou en 6).

Le chlorure d'aluminium provoque un déplacement bathochrome de tous les maxima, en particulier de la bande IV qui est déplacée à 415 nm.

Comme l'addition d'acide chlorhydrique ne modifie pas l'allure du spectre, nous pouvons conclure que la substance A_1 possède au moins un groupe hydroxyle en péri par rapport à la fonction carbonyle (position 1 ou 8) et pas de groupe dihydroxy en ortho.

En résumé, la substance A_1 possède au moins 2 groupes hydroxyles dont l'un en position 3 (ou 6) et l'autre en position 1 (ou 8).

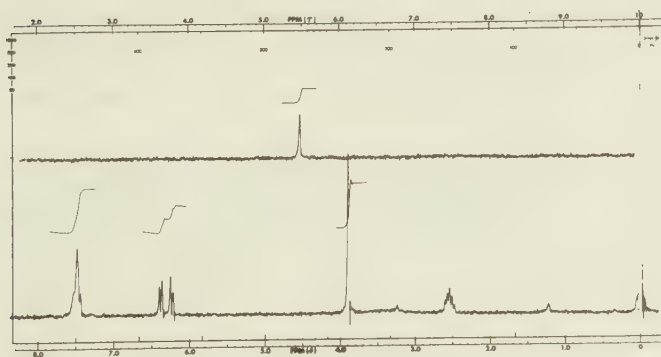


Fig.6 : Spectre RMN de A_1 dans le d_6 -diméthylsulfoxyde.

L'étude du spectre RMN nous donne les renseignements suivants : deux protons couplés en méta apparaissent à 6,24 et 6,41 ppm ($J = 2$ cps). Nous pouvons leur attribuer les positions 2 et 4, ce qui implique une substitution dans les positions 1 et 3. Les autres protons aromatiques apparaissent entre 7,42 et 7,58 ppm. La courbe d'intégration montre qu'ils sont au nombre de trois. Leurs constantes de couplage excluent des positions adjacentes, de sorte que nous devons avoir un troisième substituant en position 6 ou 7. A 3,90 ppm, se trouvent 3 protons d'un groupe méthoxyle qui constitue ainsi le 3ème substituant. A 12,84 ppm apparaît un groupe hydroxyle (position 1) fortement déblindé par le voisinage du carbonyle.

Ainsi, la substance A_1 est une xanthone trisubstituée dont les substituants sont : un groupe méthoxyle en position 6 ou 7, un groupe hydroxyle en position 1 et probablement un groupe hydroxyle en 3 masqué par les bruits de fond.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons effectué l'acétylation de A_1 par l'anhydride acétique en présence de pyridine (voir partie expérimentale). Le dérivé acétylé donne des cristaux incolores en forme d'aiguilles dont le point de fusion est de 213°C après recristallisation dans l'éthanol.

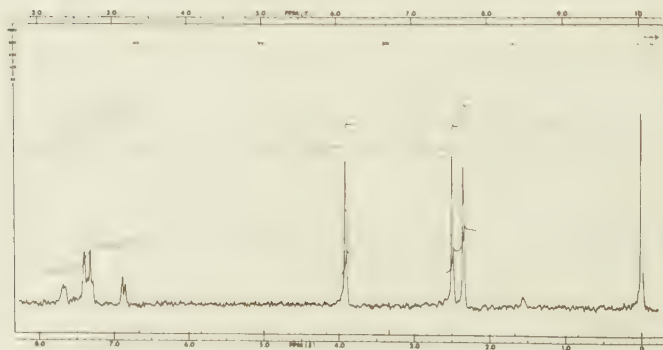


Fig. 7 : Spectre RMN de A_1 acétylé dans $CDCl_3$.

Nous retrouvons dans ce spectre les 5 protons aromatiques, 3 protons formant un groupe méthoxyle à 3,88 ppm. Les groupes acétoxyles se trouvent à $\delta = 2,48$ et $\delta = 2,33$ ppm. D'après les règles établies par MASSICOT & MARTHE [21], nous pouvons leur attribuer les positions 1 et 3.

Nous avons dès lors pensé à l'isogentisine qui fut isolée des racines de *Gentiana lutea* L. [6].

Le point de fusion de A₁, mesuré avec un échantillon authentique d'isogentisine (synthétisée selon la méthode de GROVER & SHAH [22]) ne subit aucune dépression. Les spectres UV de A₁ et de l'isogentisine sont identiques; de même, leurs spectres IR (voir fig. 8^b) sont rigoureusement superposables.

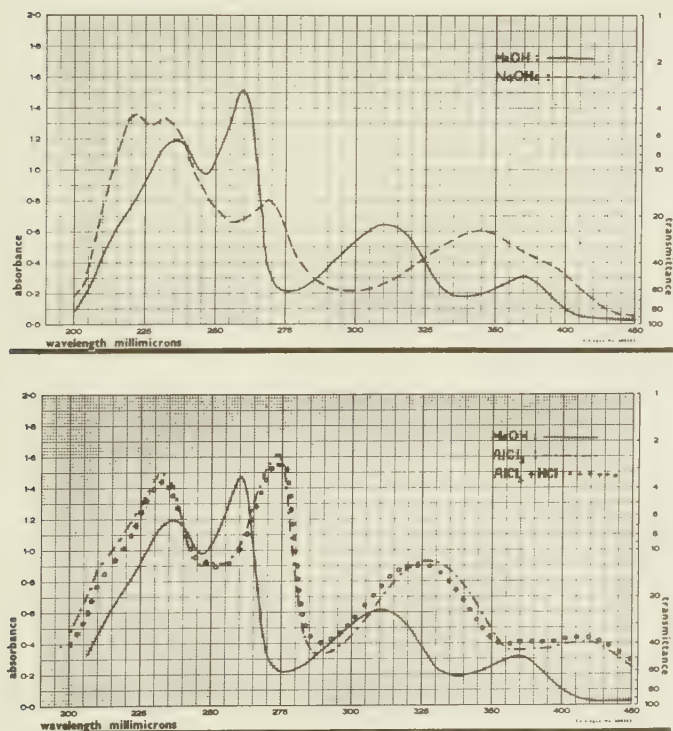


Fig. 8 : Spectre UV de l'isogentisine dans le méthanol.

Tableau 4 : Maxima d'absorption du spectre UV de
l'isogentisine

Solvant	maxima [nm]			
MeOH	370	310	259	236
+NaOMe	348	270	233	
+AlCl ₃	416	328	273	232
+AlCl ₃ /HCl	414	324	273	232

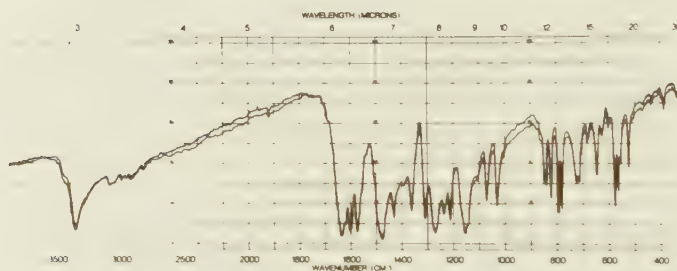
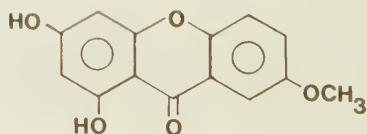


Fig. 8' : Spectres IR de A₁ et de l'isogentisine dans KBr.

Isogentisine : dihydroxy-1,3 méthoxy-7 xanthone



La substance A₁ est donc identique à l'isogentisine qui ne fut isolée qu'à partir de racines de Gentiana lutea L. [6]. Il n'est cependant pas étonnant de trouver cette xanthone également dans les feuilles de G. lutea, puisque Bellmann [19] a isolé à partir du même matériel son primevéroside en 3.

4.3. Isolement et identification de E

4.3.1. Isolement

La substance E se trouve en concentration très faible dans l'extrait méthanolique (voir fig.2). Son isolement a été effectué par chromatographie préparative sur colonne de polyamide. Une première séparation a permis d'obtenir des fractions enrichies en substance E, qui ont été soumises alors à une seconde opération de séparation par chromatographie sur colonne de polyamide. Nous avons ainsi pu obtenir E chromatographiquement pur. Nous avons procédé de la façon suivante :

Douze grammes d'extrait méthanolique dissous dans 60 ml de mélange MeOH-H₂O (9:1) sont introduits sur une colonne de polyamide Macherey-Nagel SC 6 de diamètre = 6,5 cm et de longueur = 100 cm. L'élution est effectuée avec le même solvant. L'éluat est recueilli par fractions de 20 ml à l'aide d'un collecteur automatique de fractions. Chaque fraction est analysée par chromatographie sur couches minces. Les fractions contenant E sont réunies et concentrées. On obtient environ 10 mg de substance E impure.

En répétant ces opérations plusieurs fois, il nous a été possible d'isoler 200 mg de substance E impure. Tous les essais de purification par recristallisation ayant échoué, une nouvelle séparation par chromatographie sur colonne a été entreprise.

Après passage sur une colonne de polyamide de diamètre = 2 cm et de longueur = 20 cm avec l'eau comme éluant, nous avons obtenu 18 mg de substance E chromatographiquement⁴⁾ pure.

La quantité isolée correspond à environ 40 kg de feuilles fraîches de Gentiana lutea (~ 4 kg de matériel sec). La détermination de structure a été effectuée sur E isolé à partir de feuilles de Gentiana villarsii. Cette dernière espèce contient, en effet, E en grande quantité : à partir de 300 g de matériel sec, il a été possible d'isoler 700 mg de cette substance. Nous avons montré (voir chapitre 5) que E isolé à partir de Gentiana lutea est identique à E isolé à partir de Gentiana villarsii (vérification : R_f , points de fusion, spectres UV et IR, même comportement lors de l'hydrolyse acide).

4) CCM de polyamide: solvant MeOH-H₂O (9:1), rév.: UV 350 nm
 $R_f = 0,70$

CCM de cellulose: solvant AcOH 15%, rév.: UV 350 nm
 $R_f = 0,55$

4.3.2. Détermination de structure

Après recristallisation dans l'eau, la substance E se présente sous forme d'un solide jaune pâle se décomposant à 216°C.

L'étude des spectres UV nous permet de tirer les renseignements suivants :

Le spectre UV de la substance E dans MeOH est caractéristique d'une flavone [23]. L'addition d'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de 43 nm de la bande I (celle à 335 nm) et de 4 nm de la bande II, d'où présence probable d'un groupe hydroxyle en position 7. L'addition de NaOMe provoque un important déplacement bathochrome de la bande I (45 nm) avec diminution de l'intensité. La position 4' n'est probablement pas occupée par un groupe hydroxyle. L'addition de chlorure d'aluminium, suivie de celle d'acide chlorhydrique, montrent la présence probable d'un groupe hydroxyle en 5 et excluent la présence de 2 groupes hydroxyles en ortho [23].

Tableau 5 : Maxima d'absorption des spectres UV de la substance E

Solvant	Maxima [nm]				
MeOH	235	272		242	
+AcONa	278	276			231
+MeONa	280	~ 205	~ 278	268	242
+AlCl ₃	~ 372	352	~ 295	282	
+AlCl ₃ /HCl	~ 370	348	~ 295	280	

~ : point d'inflexion

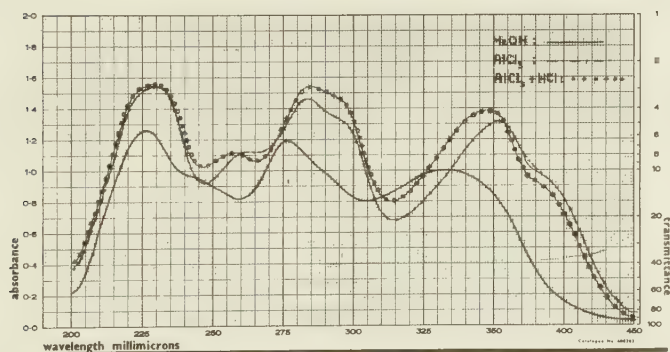
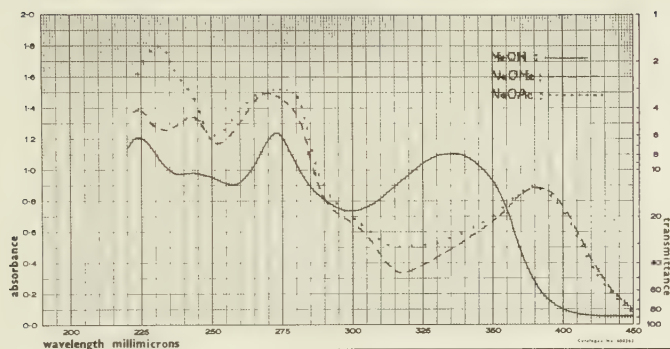


Fig. 9 : Substance E, spectres UV.

L'hydrolyse acide de la substance E est effectuée par chauffage à reflux dans l'acide chlorhydrique 2 N pendant 5 heures (voir partie expérimentale). Les aglycones sont extraits au n-BuOH et analysés par CCM de cellulose.

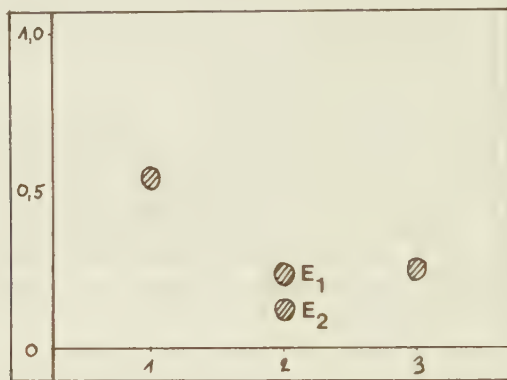
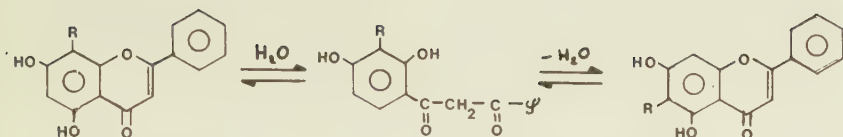


Fig. 10 : Chromatogramme de la substance E hydrolysée.
Support: cellulose Merck; solvant: AcOH 15%;
rév.: UV 350 nm.

1. E
2. E hydrolysé
3. isoorientine

La disparition du spot initial et l'apparition de 2 nouveaux spots à valeur R_f plus petite que celle de E, dont l'une correspond à l'isoorientine, montre que E est un O-glycoside de C-glucoside. En effet, les C-glucosides possédant un groupe hydroxyle libre en position 5 s'isomérisent par ouverture de l'hétérocycle flavonique en β -dicétone, selon le schéma de WESSELY-MOSER des hydroxy-5-flavones [24].



Ainsi, un 8-C-glucoside se transforme partiellement en 6-C-glucoside et vice-versa.

La phase aqueuse a été utilisée en vue de la recherche des sucres (voir partie expérimentale). L'analyse par chromatographie sur papier donne le résultat suivant :

Tableau 6 : Recherche des sucres par chromatographie sur papier
Comparaison des valeurs R_f de l'hydrolysât de E avec le D-glucose.

solvant a) acétate d'éthyle - pyridine - eau (2:1:2)
b) n-butanol - pyridine - eau (6:4:3).

Substance	R_f		Rév.:
	solvant a	solvant b	
<u>E</u> hydrolysé	0,37	0,21	jaune-brun
D-glucose	0,37	0,22	jaune-brun

Le sucre issu de l'hydrolyse de E est du D-glucose.

Les aglucones de $\underline{E}$ ($\underline{E}_1$ et $\underline{E}_2$) ont été séparés par chromatographie sur colonne de cellulose⁵⁾ avec le solvant AcOH 15%. Les valeurs R_f , dans différents solvants, correspondent aux C-glucosides orientine et isoorientine [25].

Tableau 7 : Valeurs R_f des aglucones de $\underline{E}$, de l'orientine et de l'isoorientine, dans différents systèmes de solvants et sur différents supports.

Solvants	a	b	c	d
$\underline{E}_1$	0,24	0,48	0,30	0,18
$\underline{E}_2$	0,10	0,28	0,35	0,05
isoorientine	0,23	0,45	0,30	0,18
orientine	0,10	0,28	0,35	0,05

a) cellulose Merck: AcOH 15%

b) cellulose Merck: AcOH 30%

c) polyamide Merck: MeOH 80%

d) papier Schleicher & Schüll: AcOH 5%

isoorientine: R_1 = glucosyle, R_2 = H

(6-C- β -D-glucopyranosyllutéoline)

orientine: R_1 = H, R_2 = glucosyle

(8-C- β -D-glucopyranosyllutéoline)

5) Cellulose microcristalline Merck

Les spectres IR de E_1 et de l'isoorientine sont rigoureusement superposables (voir fig. 11); il en est de même des spectres UV, mesurés en présence des réactifs habituels.

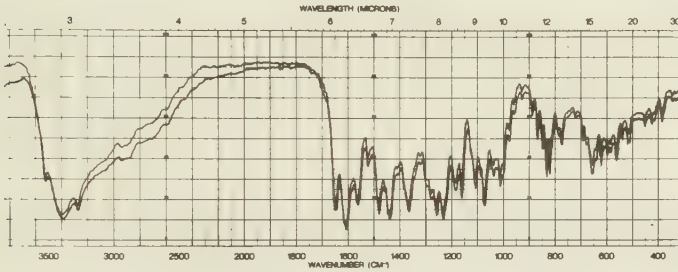


Fig. 11 : Spectres IR de E_1 et de l'isoorientine dans KBr.

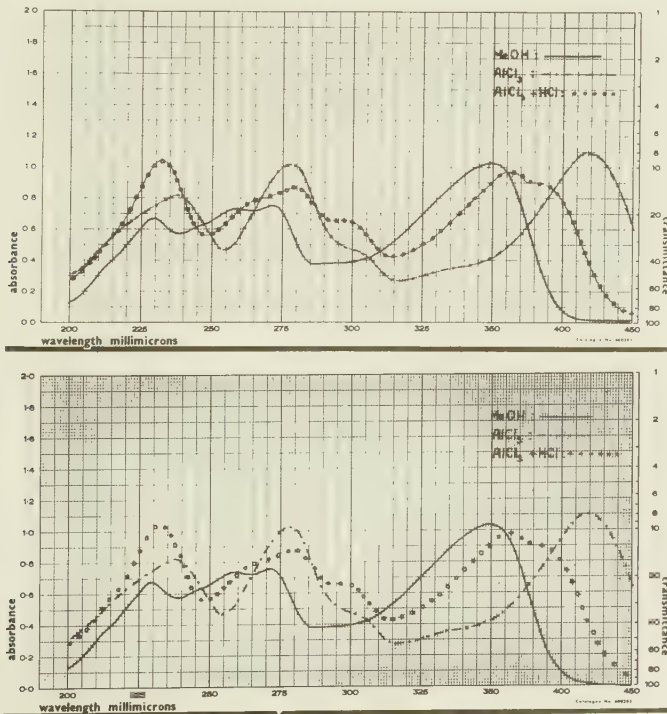


Fig. 12 : Spectres UV de E_1 et de l'isoorientine dans le méthanol

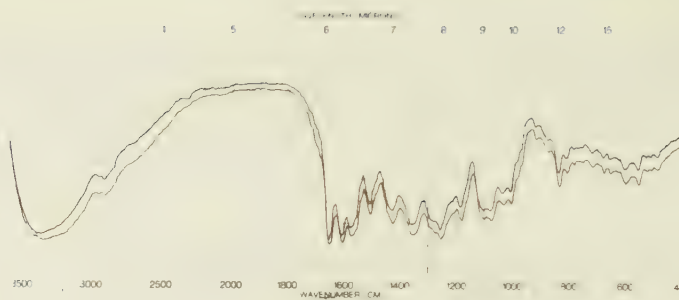


Fig. 13 : Spectres IR de E_2 et de l'orientine dans KBr.

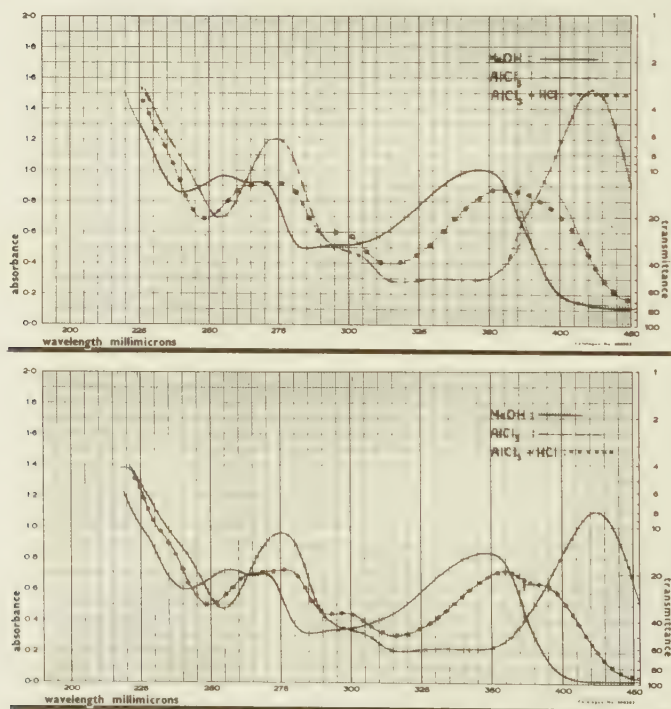


Fig. 14 : Spectres UV de E_2 et de l'orientine dans le méthanol.

Ainsi, la substance E donne, après hydrolyse acide, du glucose et les C-glucosides orientine et isoorientine. Elle est par conséquent un O-glucoside, soit de l'orientine, soit de l'isoorientine.

Afin de déterminer si le sucre est attaché à l'orientine ou à l'isoorientine, nous avons procédé à une hydrolyse acide de E. A cet effet, 70 mg de E ont été chauffés à reflux avec 10 ml de MeOH et 60 ml HCl 1N. Des prélèvements de 3 ml, effectués à intervalles réguliers, nous ont permis de suivre le déroulement de l'hydrolyse. Pour chaque prélèvement, les aglucones ont été extraits au n-BuOH et analysés par CCM. La phase aqueuse a été employée pour la recherche des sucres: pour chaque prélèvement, nous avons pu vérifier la présence de glucose.

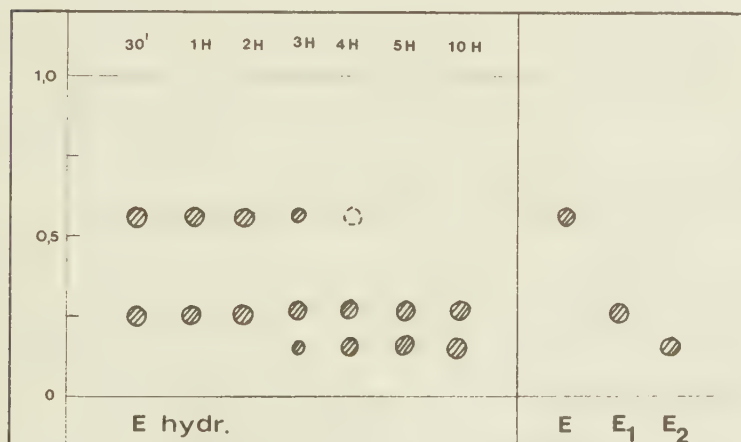


Fig. 15 : Chromatogramme des aglucones de E.

Support : cellulose Merck.

Solvant : AcOH 15%. Rév.: UV 350 nm.

E₁ = isoorientine, E₂ = orientine

L'expérience décrite ci-dessus montre que la substance E donne par hydrolyse d'abord l'isoorientine, qui s'isomérisse peu à peu en orientine. Elle est donc un O-glucoside de l'isoorientine.

L'examen du spectre RMN de E nous permet de tirer les renseignements suivants :

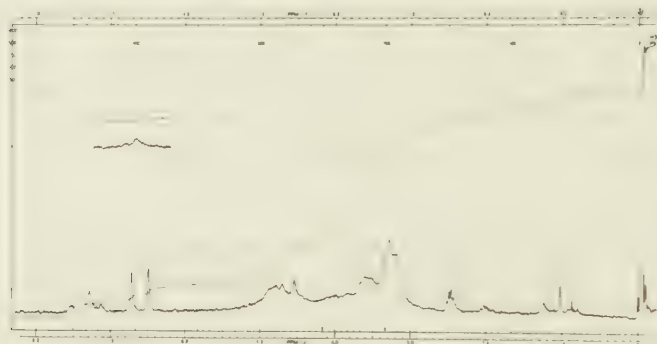


Fig. 16 : Spectre RMN de E dans d_6 -DMSO.

Tableau 8 : Résumé du spectre RMN de E

δ en ppm	3-5,5	6,52	6,74	7,1-7,6	13,40
Nombre de protons	23	1	1	3	1

Dans la région de $\delta = 3 - 5,5$ ppm, on trouve 22 - 24 protons correspondant aux protons des sucres. A 6,52 ppm, on observe un singulet pouvant être attribué au proton en 8 du noyau A. Un autre singulet à 6,74 ppm correspond au proton hétérocyclique (position 3). Entre 7,1 et 7,6 ppm, on trouve les 3 protons du noyau B. Enfin, un signal à $\sim 13,40$ ppm confirme la présence de l'hydroxyle en 5 [19].

La nature hétérosidique de la substance E est confirmée: le nombre de protons indique qu'il s'agit vraisemblablement d'un disaccharide. Les spectres RMN des dérivés acétylés permettant de tirer davantage de renseignements [26], nous avons effectué l'acétylation de E par l'anhydride acétique en présence de pyridine (voir partie expérimentale).

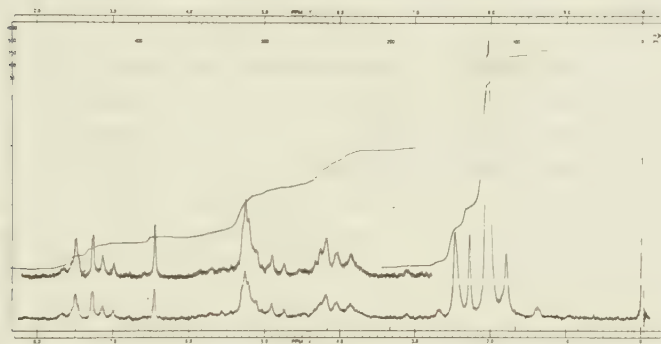


Fig. 17 : Spectre RMN de E acétylé dans CDCl_3 .

Tableau 9 : Résumé du spectre RMN de E acétylé

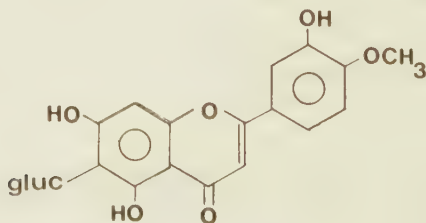
δ en ppm	1,78-1,80	1,98-2,08	2,27	2,40-2,50	3,50-6,0	6,46	7,08	7,29	7,50	7,58
Nombre de protons	3	21	3	6	14	1	1	1	1	1

Vers 1,80 ppm, on trouve le groupe acétoxy en 2" du sucre relié au squelette flavonique par une liaison carbone. D'après GENTILI & HOROWITZ [27], ce signal est typique d'un 6-C-glucoside. Entre 1,98 et 2,08 ppm, apparaissent 21 protons corres-

pondant à 7 acétoxyles de sucres. A 2,27 ppm et entre 2,40 et 2,50 ppm, on trouve 3 groupes acétoxyles aromatiques correspondant aux positions 3' (évent. 4'), 5 et 7, par analogie avec le spectre RMN de l'isoorientine acétylée [19]. Entre 3,50 et 6,0 ppm, se trouvent 14 protons correspondant aux sucres. Parmi eux, à 4,86, le proton en position 1" du sucre (constante de couplage $J = 10$ cps) indique que nous avons la conformation β [26]. Cinq protons aromatiques apparaissent entre 6,46 et 7,58 ppm :

singulet	à 6,46 ppm pour le proton H-3	
douplet	à 7,08 ppm	H-5'
singulet	à 7,29 ppm	H-8
singulet	à 7,50 ppm	H-2'
douplet	à 7,58 ppm	H-6'

Le spectre RMN de E acétylé indique la présence de 8 groupes acétoxyles aliphatiques et de 3 groupes acétoxyles aromatiques. Il confirme l'hypothèse que la substance E est un O-glucoside de l'isoorientine. De plus, il montre que le glucose, relié au squelette flavonique par une liaison osidique classique, doit se trouver sur le cycle B, probablement en position 4', car le spectre de E acétylé présente une grande analogie avec le spectre de la 6-C- β -D-glucosyldiosmétique acétylée [27].



6-C- β -D-glucosyldiosmétique

Ces observations sont en excellent accord avec l'étude des spectres UV de E et de E hydrolysé qui conclut que le sucre se trouve sur le cycle B, probablement en position 4'. En vue de déterminer avec exactitude la position d'at-tache du sucre, nous avons méthylé les -OH phénoliques de E avant d'entreprendre l'hydrolyse acide.

La méthylation a été effectuée avec le diazométhane selon les indications de ROSPRIM [28] (voir partie expérimenta-le). Nous avons vérifié que celle-ci était totale par l'étu-de des spectres UV. Nous n'avons enregistré aucune modifi-cation du spectre après adjonction de chlorure d'aluminium et de méthylate de sodium. Après hydrolyse par l'acide chlorhydrique et purification de l'aglucone par chromato-graphie sur colonne de Sephadex G 10 (éluant: H_2O), le spectre UV de E méthylé, hydrolysé présente les caractéris-tiques suivantes :

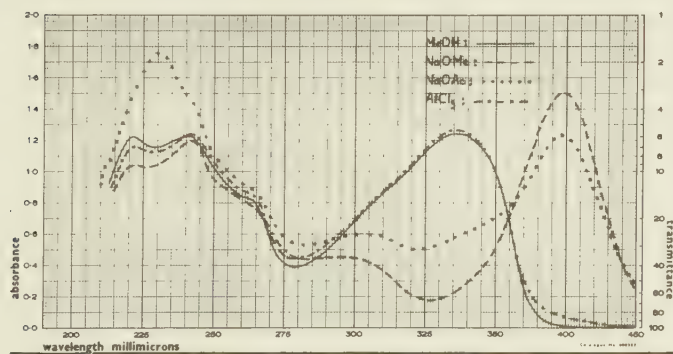


Fig. 18 : Spectre UV de E méthylé, hydrolysé dans le méthanol.

Tableau 10 : Maxima d'absorption du spectre UV de E méthylé, hydrolysé

Solvant	maxima [nm]			
MeOH	336	264	243	
+AlCl ₃	336	264	243	
+NaOAc	398	305	264	243
+NaOMe	398	300	264	243

L'addition de chlorure d'aluminium ne provoque aucune modification du spectre: pas de groupe ortho di-OH, ni de -OH libre en position 5. En revanche, l'addition de NaOMe conduit à un déplacement bathochrome important de la bande I (62 nm) avec augmentation de l'intensité. L'addition de NaOAc provoque à peu de chose près le même déplacement. Ces caractéristiques sont dues de manière certaine à la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 4'.

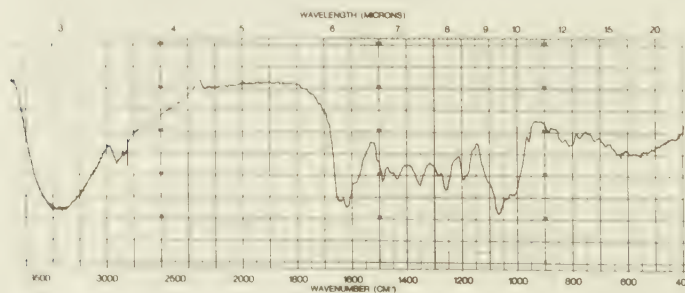
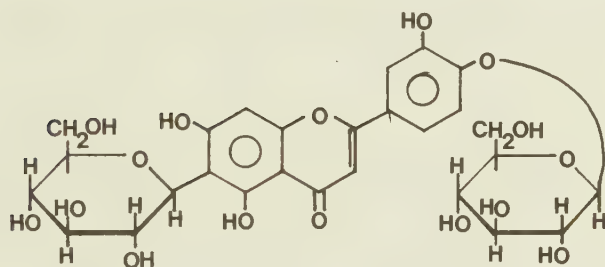


Fig. 19 : Spectre IR de la substance E dans KBr.

En conclusion, la substance E est un O-glucoside en 4' du C-glucoside isoorientine. Sa présence vient d'être signalée pour la première fois par WILLIAMS & MURRAY [29] dans les feuilles de Briza media L. (Gramineae). Ces auteurs n'en ont cependant pas établi la structure: ils ont décrit le comportement chromatographique, le comportement à l'hydrolyse et le spectre UV.



E O- β -D-glucopyranosyl-4'-isoorientine

4.4. Isolement et contribution à l'identification de F

La substance F est présente en très faible quantité dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Gentiana lutea* L. (voir fig. 1). L'isolement a été effectué selon le même procédé que pour la substance E : les fractions enrichies en substance F ont été purifiées par passage sur une colonne de polyamide, avec l'eau comme éluant. A partir de 2 kg de feuilles séchées, il a été possible d'isoler environ 20 mg de substance F chromatographiquement pure :

CCM polyamide Merck (MeOH-H₂O, 9:1): $R_f = 0,80$

CCM cellulose Merck (AcOH 15%): $R_f = 0,68$

Nous avons montré (voir chapitre 5) que la substance F est également présente dans les feuilles de *Gentiana villarsii*, mais en concentration nettement plus grande. A partir de 200 g de feuilles séchées de cette dernière espèce, nous avons isolé, selon le procédé décrit ci-dessus, 150 mg de substance F.

Tableau 11 : Maxima des spectres UV de la substance F

Solvant	maxima [nm]			
MeOH	326		274	
+AlCl ₃	380	342	302	283
+AlCl ₃ /HCl		340	300	282
+NaOMe	375		282	
+NaOAc	375		280	

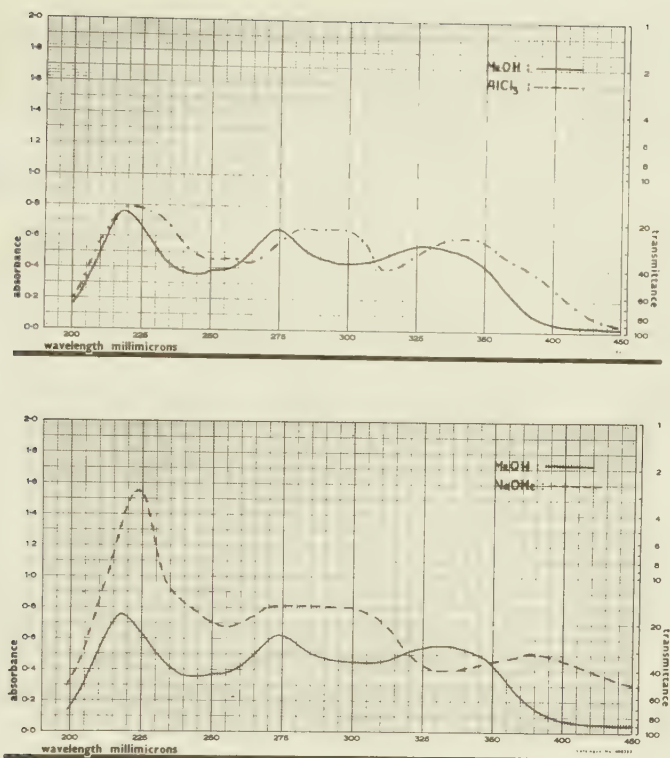


Fig. 20 : Spectre UV de F dans le méthanol.

Les spectres UV de F sont typiques d'une flavone possédant un groupe hydroxyle libre en position 5 [23]. Le déplacement bathochrome de la bande I, avec diminution de l'intensité, produit par l'addition de NaOMe, indique que la position 4' est probablement substituée. L'addition de NaOAc provoque à peu de chose près les mêmes déplacements bathochromes que NaOMe. Le déplacement bathochrome de 6 nm de la bande II montre la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 7.

BELLMANN [19] avait constaté que l'hydrolyse acide de la substance F donne naissance à 2 substances de R_f inférieur, dont l'une semblait correspondre à l'isovitexine, l'autre à son isomère, la vitexine.

isovitexine:

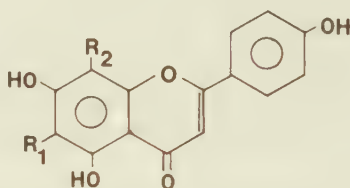
R_1 = glucosyle

R_2 = H

vitexine:

R_1 = H

R_2 = glucosyle



Nous avons répété l'hydrolyse acide de la substance F en la chauffant à reflux avec HCl 1N (voir partie expérimentale). Afin d'en suivre le déroulement, nous avons effectué des prélèvements à intervalles réguliers. Pour chaque prélèvement, les aglucones ont été extraits au n-BuOH et analysés par CCM.

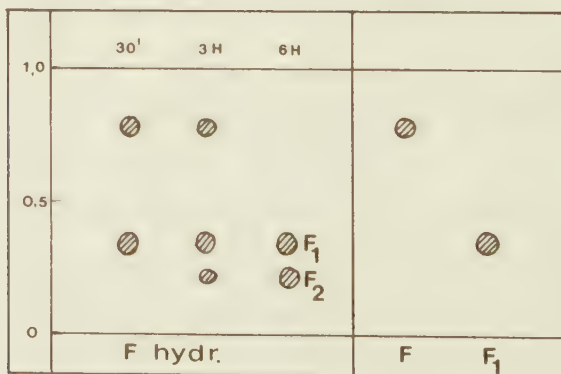


Fig. 21 : Chromatogramme de l'hydrolyse de F.

Support : cellulose Merck. Solvant : AcOH 15%.

Rév.: UV 350 nm. F_1 = isovitexine

Le comportement chromatographique des aglucones de la substance F, à savoir F₁ et F₂, est résumé dans le tableau 12.

Tableau 12 : Valeurs R_f des aglucones de F

	cellulose (AcOH 15%)	polyamide (MeOH-H ₂ O, 8:2)
<u>F</u> ₁	0,40	0,38
<u>F</u> ₂	0,20	0,40
isovitexine	0,41	0,38
vitexine	0,18 ⁶⁾	0,39 ⁶⁾

La figure 21 montre que la substance F donne par hydrolyse acide l'isovitexine, qui s'isomérisse peu à peu en vitexine par transposition de WESSELY-MOSER [24].

La recherche des sucres, effectuée par chromatographie sur papier (voir partie expérimentale), permet de mettre en évidence du glucose.

Par chromatographie préparative sur colonne de cellulose avec le solvant AcOH 15%, nous avons obtenu l'aglucone F₁ chromatographiquement pur.

6) Ne disposant pas d'échantillon authentique de vitexine, nous citons les valeurs indiquées par la littérature [25].

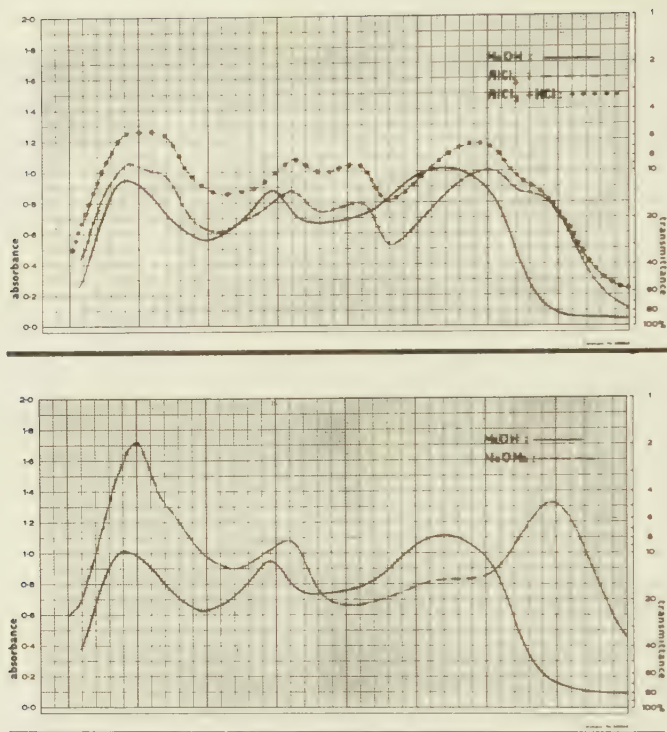


Fig. 22 : Spectre UV de F hydrolysé dans le méthanol.

Tableau 13 : Maxima d'absorption du spectre UV de F hydrolysé

Solvant	maxima [nm]			
MeOH		335		273
+AlCl ₃	380	349	303	281
+AlCl ₃ /HCl	380	346	304	280
+NaOMe	398	335		280

Le spectre UV de F hydrolysé correspond tout à fait à celui de l'isovitexine [23] :

Tableau 14 : Maxima d'absorption du spectre UV de l'isovitexine [23]

Solvant	maxima [nm]			
EtOH	336 272			
+AlCl ₃	379	342	303	280
+EtONa	402	333		279

Par conséquent, la substance F est un O-glucoside du C-glucoside isovitexine. Le sucre est probablement attaché au squelette flavonique en position 4', puisque le spectre UV de F avant l'hydrolyse montre que cette position est substituée (voir fig. 20).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons méthylé les groupes hydroxyles phénoliques et examiné les spectres UV de la substance F méthylée, avant et après hydrolyse acide.

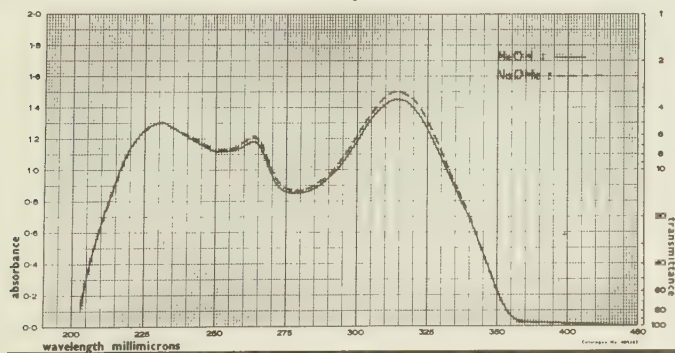


Fig. 23 : Spectre UV de F méthylé.

Tableau 15 : Maxima d'absorption du spectre UV de F méthylé

Solvant	maxima [nm]		
MeOH	315	263	231
+AlCl ₃	315	263	231
+NaOMe	315	263	229

Le spectre UV ci-dessus montre que la substance F est totalement méthylée, puisqu'il n'y a aucune modification de l'allure du spectre par addition de AlCl₃ et de NaOMe.

La substance F méthylée est hydrolysée, puis purifiée par passage sur colonne de Sephadex G 10 (éluant: H₂O). Son spectre UV est le suivant :

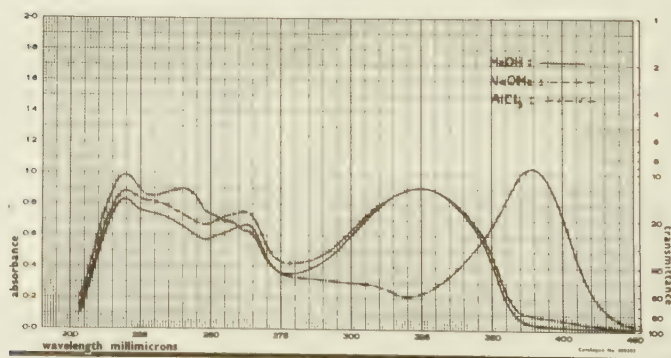


Fig. 24 : Spectre UV de F méthylé hydrolysé.

Tableau 16 : Maxima d'absorption du spectre UV
de F méthylé hydrolysé

Solvant	maxima [nm]		
MeOH	326	263	
+AlCl ₃	326	263	
+NaOMe	364	307	264

L'addition de chlorure d'aluminium ne modifie pas l'allure du spectre; on peut donc conclure à l'absence de groupe hydroxyle en position 5. En revanche, le méthylate de sodium produit un déplacement bathochrome de 38 nm de la bande I avec augmentation de l'intensité, ce qui suggère la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 4'. Ainsi, la substance F est le glucoside en 4' de l'isovitexine.

La présence du 4'-glucoside de l'isovitexine a été signalée pour la première fois par LITVINENKO & COLL. [30] dans les feuilles de Vaccaria segetal (Caryophyllaceae) et Gypsophila (Caryophyllaceae), et dernièrement par WILLIAMS & MURRAY [29] dans les feuilles de Briza media (Gramineae). Le comportement chromatographique et le spectre UV de la substance F correspondent aux données de la littérature.

Le résultat que nous avons obtenu infirme les conclusions de BELLMANN [19], lequel supposait, d'après le spectre RMN de F acétylé, la présence de 3 unités hexapyranosiques en plus du reste C-glucosyle. L'expérience nous a révélé que la substance isolée par Bellmann était impure.

N. B. Le spectre RMN de F acétylé, que nous avons relevé au moment de mettre sous presse, confirme qu'il s'agit bien du O-glucoside en 4' de l'isovitexine.

5. PHYTOCHIMIE COMPAREE DE LA SECTION COELANTHE

La section Coelanthé, une des 19 sections du genre Gentiana, comprend 6 espèces morphologiquement bien distinctes, à savoir [31] :

- Gentiana lutea L.
- Gentiana purpurea L.
- Gentiana punctata L.
- Gentiana pannonica Scop.
- Gentiana villarsii (Griseb.) Ronn.
- Gentiana burseri Lapeyr.

Certains auteurs hésitent cependant à classer Gentiana lutea dans la section Coelanthé, car cette dernière espèce diffère sensiblement des autres espèces de la section (corolle presque dialypétale) [31].

Nous nous sommes proposé de rechercher les composés flavoniques et xanthoniques, ainsi que le bornésitol dans toutes les espèces de la section Coelanthé. En effet, nous voulions établir si les substances nouvellement isolées dans Gentiana lutea se trouvaient également dans les autres espèces et si leur distribution pouvait être considérée comme générale à l'intérieur de cette section.

5.1. Précautions à prendre

Nous pensons qu'il est dangereux d'entreprendre un travail de phytochimie comparée sans prendre certaines précautions.

- Il faut tout d'abord comparer les populations entre elles. C'est la raison pour laquelle, nous avons examiné

le contenu flavonique d'extraits méthanoliques de feuilles de Gentiana lutea de différentes provenances :

Jura (Mont Crosin)

Valais (Col de la Forclaz)

Hautes-Alpes françaises (Val du Melezet)

Les chromatogrammes ne montrent aucune différence.

- Le contenu flavonique peut subir des variations au cours de l'année. Il est par conséquent indiqué de cueillir les plantes toujours à la même époque, par exemple pendant la floraison, et cela également pour éviter de confondre les espèces.

- Il est indispensable de prélever les feuilles sur la même partie de la plante. Nous nous sommes limités à la hampe florale. Le prélèvement de feuilles sur les touffes stériles n'est pas indiqué parce que l'on peut trouver au même endroit, côte à côte, des espèces différentes. (Par exemple, dans les Pyrénées orientales, Gentiana lutea et Gentiana burseri).

- Il est insuffisant de baser un travail de phytochimie comparée uniquement sur l'examen chromatographique des différents extraits, car des taches de même couleur et de même R_f ne sont pas forcément constituées des mêmes substances. Dans le présent travail, nous avons isolé les composés polyphénoliques de chaque espèce par chromatographie préparative sur colonne. Les critères de comparaison employés sont les suivants :

- étude du comportement chromatographique
- étude du comportement à l'hydrolyse acide
- étude des spectres UV
- comparaison des spectres IR
- point de fusion (pour les glycosides, ce dernier critère ne convient pas toujours, car la littérature indique souvent, pour la même substance, des points de fusion fort divergents).

La méthode que nous avons employée nous semble la plus sûre, cependant elle exige beaucoup de matériel. Elle ne pourrait que très difficilement être appliquée à la phytochimie comparée d'espèces rares et ne possédant que de petites feuilles.

5.2. Provenance du matériel végétal

- Gentiana lutea : Mont Crosin, Canton de Berne, alt. 1100 m.
- Gentiana purpurea : Barberine, Valais, alt. 2000 m.
- Gentiana punctata : Muottas Muragl, Grisons, alt. 2300 m.
- Gentiana pannonica : Churfirirsten, Canton de St-Gall, alt. 2100 m.
- Gentiana villarsii : Ceillac/Val du Melezet, Dpt Hautes-Alpes, France, alt. 2000 m.
- Gentiana burseri : Col de Puymorens, Dpt Pyrénées orientales, France, alt. 1900 m.

5.3. Isolement des composés flavoniques

Les feuilles séchées, moulues ont été extraites par des solvants à polarité croissante : ligroïne, éther, acétate d'éthyle, méthanol (voir schéma d'extraction fig. 2). Les différents extraits ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie sur couche mince de polyamide avec les solvants suivants : MeOH - H₂O (9:1) et MeOH - H₂O - AcOH (90:5:5). Les extraits ligroïniques et étherés ne semblent pas contenir des composés flavoniques ou xanthoniques. Les extraits à l'acétate d'éthyle contiennent, en faible quantité, les monoglycosides. Les extraits méthanoliques sont formés, en plus des monoglycosides, de composés à R_f plus

élevé. C'est la raison pour laquelle, l'isolement a été entrepris à partir de ces derniers extraits. La figure 25 donne un aperçu général des composés flavoniques présents.

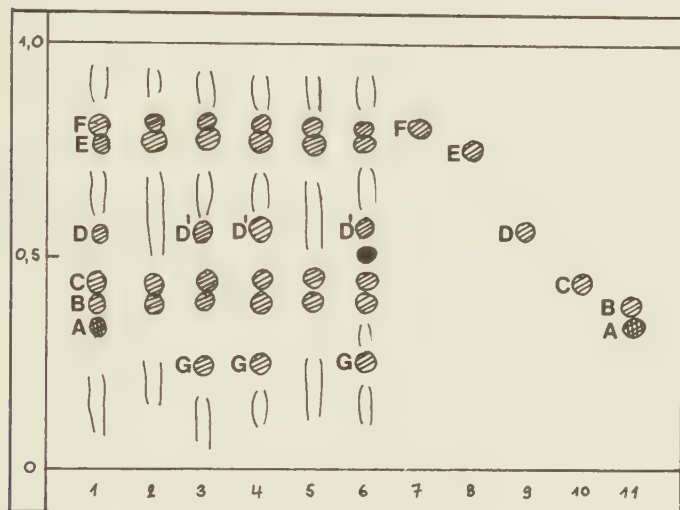


Fig. 25 : Chromatogramme des extraits méthanoliques des espèces de la section Coelanthé.

Support : polyamide Merck, solvant : MeOH-H₂O (9:1) Rév. : UV 350 nm.

▨ : brun

▩ : jaune

● : bleu clair

Témoins :

1) G. lutea

7) substance F

2) G. purpurea

8) substance E

3) G. punctata

9) gentioside = D

4) G. pannonica

10) isovitexine = C

5) G. villarsii

11) isoorientine +

6) G. burseri

mangiférine = B + A

A première vue, il semble que les substances B (isoorientine) et C (isovitexine) et leur glucoside en 4', E et F, soient présents dans tous les extraits. Les substances B et E se trouvent en concentration très forte, tandis que la substance F et surtout la substance C ne se trouvent qu'en traces. La substance D n'apparaît pas dans toutes les espèces. Par contre, une substance G à R_f plus petit que la substance A apparaît dans *G. punctata*, *G. pannonica*, *G. burseri*. Enfin, le chromatogramme montre l'absence de la substance A dans toutes les espèces de la section, excepté dans *Gentiana lutea*.

L'isolement des composés par chromatographie préparative sur colonne, à partir des extraits méthanoliques, a été effectué de la manière suivante : 12 - 15 g d'extrait méthanolique (correspondant à 100 g de feuilles sèches) dissous dans 50-70 ml de solvant MeOH-H₂O (:1) sont introduits sur une colonne de polyamide Macherey-Nagel SC 6 de longueur 100 cm et de diamètre intérieur 6,5 cm. L'élution est effectuée avec le solvant MeOH-H₂O (:1). L'éluat est recueilli par fractions de 20 ml à l'aide d'un collecteur automatique. Chaque fraction est analysée par CCM et les fractions identiques sont réunies, concentrées. Les fractions contenant des substances pures sont abandonnées dans l'armoire frigorifique en vue de la cristallisation, les autres soumises à une seconde séparation par chromatographie sur colonne. La figure 26 donne le schéma général d'isolement des différentes substances.

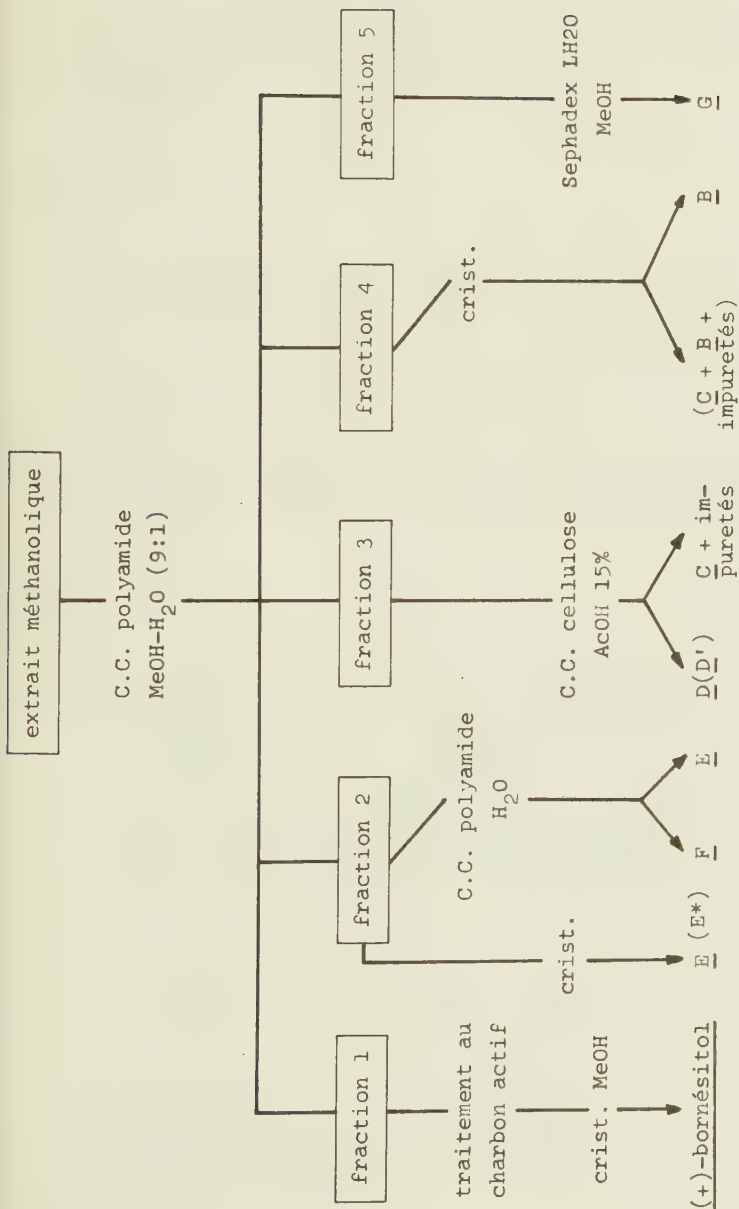


Fig. 26 : Schéma général d'isolement

(L'analyse révèle que D' n'est pas identique à D; voir détails ci-après)

5.4. Analyse comparative du (+)-bornésitol

Le (+)-bornésitol, isolé selon le schéma de la figure 26, est présent dans toutes les espèces de la section Coelanthé. Il a été purifié par recristallisation dans le méthanol. La comparaison a été effectuée avec un échantillon authentique de (+)-bornésitol, isolé à partir de feuilles de Gentiana lutea.

Les cristaux incolores fondent à 206°C. Le point de fusion effectué avec le témoin ne subit aucune dépression. Le pouvoir rotatoire spécifique, mesuré à 25°C dans l'eau, est identique à celui du témoin, soit $[\alpha]^{25^\circ} = + 32,1^\circ$.

Les spectres IR du (+)-bornésitol isolé à partir des différentes espèces et du témoin sont rigoureusement superposables. La figure 27 représente les spectres IR du (+)-bornésitol isolé à partir de Gentiana burseri et de l'échantillon authentique.

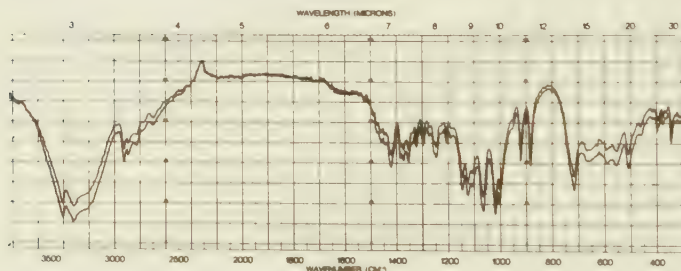


Fig. 27 : Spectres IR du (+)-bornésitol isolé à partir de Gentiana burseri et du témoin, dans KBr.

Le (+)-bornésitol se trouve en quantité relativement élevée dans les feuilles de toutes les espèces de la section Coelanthé (0,5 à 2% du matériel sec). Ceci est d'un grand

intérêt, car le (+)-bornésitol est peu répandu dans la nature. Il n'a été décelé jusqu'ici que dans 13 espèces de la famille des Apocynacées [32] (famille très proche des Gentianées) et dans Sarcocephalus diderrichii Walt. (Rubiacees) [33].

5.5. Analyse comparative de F

La substance F (voir chromatogramme fig. 25) a pu être obtenue chromatographiquement pure à partir de toutes les espèces étudiées. Tous les essais de cristallisation ayant échoué, nous avons évaporé le solvant (méthanol-eau) et obtenu un produit amorphe de couleur jaune se décomposant de 194 à 210°C.

Le comportement chromatographique est identique à celui de F isolé à partir des feuilles de Gentiana lutea :

$R_f = 0,80$ sur polyamide Merck, MeOH-H₂O (9:1)

$R_f = 0,68$ sur cellulose Merck, AcOH 15%

L'hydrolyse acide conduit à du glucose et à 2 spots de R_f inférieur correspondant à l'isovitexine et à la vitexine.

Enfin, les spectres UV effectués dans le méthanol en présence des réactifs habituels sont identiques, de même les spectres IR rigoureusement superposables. La figure 28 montre les spectres IR de la substance F isolée à partir de Gentiana lutea et de celle isolée à partir de Gentiana villarsii.

La substance F se trouve en concentration faible dans toutes les espèces de la section (10-75 mg correspondent à 100 g de feuilles séchées). La concentration la plus grande a été observée chez Gentiana villarsii.

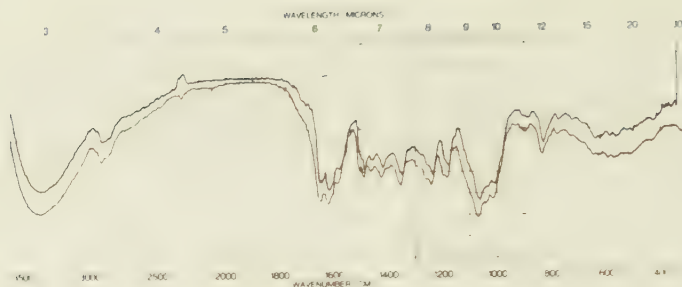


Fig. 28 : Spectres IR de F (lutea) et de F (villarsii) dans KBr.

5.6. Analyse comparative de E

Le chromatogramme des extraits méthanoliques des différentes espèces étudiées (voir fig. 25) montre que la distribution de E est générale dans toute la section.

Après une première purification par chromatographie sur colonne de polyamide avec comme éluant l'eau, suivie d'une recristallisation dans l'eau, nous avons obtenu la substance E pure sous forme de microcristaux jaune pâle se décomposant entre 210 et 220°C.

Le comportement chromatographique est tout à fait identique à celui de E isolé à partir de Gentiana lutea :

$R_f = 0,70$ sur polyamide Merck, MeOH-H₂O (9:1)

$R_f = 0,55$ sur cellulose Merck, AcOH 15%

L'hydrolyse acide conduit au glucose et à 2 spots de R_f inférieur correspondant à l'isoorientine et à l'orientine.

Les spectres UV sont identiques et les spectres IR rigoureusement superposables. A titre d'exemple, la figure 29 représente les spectres IR de E isolé à partir de Gentiana lutea et de E isolé à partir de Gentiana villarsii.

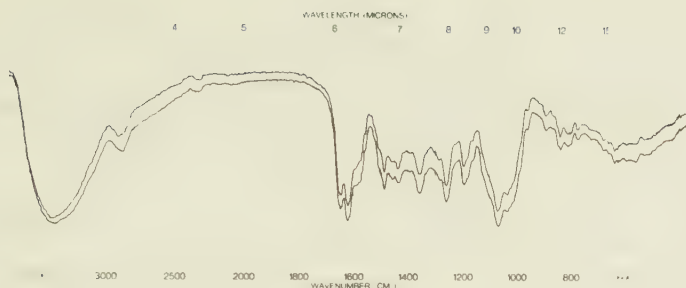
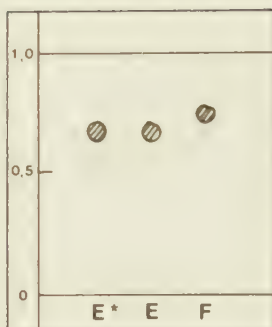


Fig. 29 : Spectres IR de E (lutea) et de E (villarsii).

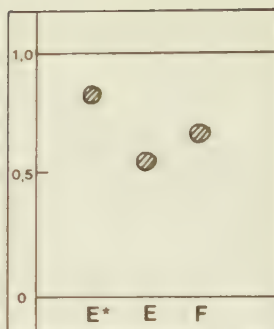
Nous avons ainsi montré que la substance E est présente dans les feuilles de toutes les espèces de la section Coelanthé. Elle se trouve en traces dans les feuilles de Gentiana lutea, mais en concentration appréciable dans celles de Gentiana villarsii (300-400 mg pour 100 g de feuilles séchées). Dans les autres espèces, la concentration est plus faible : de l'ordre de 50-100 mg pour 100 g de feuilles séchées.

5.6.1. Substance E*

Lors de l'isolement de la substance E à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de Gentiana burseri, nous avons remarqué la formation de cristaux jaunes en forme de fines aiguilles dans la fraction 2 (voir schéma général d'isolement fig. 26). Le comportement chromatographique de cette substance E* est indiqué dans la figure 30.



Polyamide Merck
 MeOH-H₂O (9:1)
 Rév.: UV 350 nm



Cellulose Merck
 AcOH 15%
 Rév.: UV 350 nm

Fig. 30 : Chromatogrammes de la substance E*.

Nous constatons que le comportement chromatographique de E et de E* est le même sur polyamide, mais nettement différent sur cellulose. E* n'est probablement pas identique à E. Cependant, leurs spectres IR dans KBr sont pratiquement superposables.

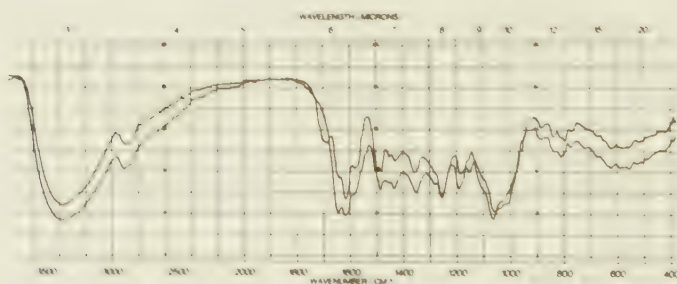


Fig. 31 : Spectres IR de E* et de E dans KBr.

Afin de lever cette indétermination, nous avons effectué les spectres UV de $\underline{E}^*$ dans le méthanol en présence des réactifs habituels. Le tableau 17 donne les maxima d'absorption des spectres UV de $\underline{E}^*$ et de $\underline{E}$.

Tableau 17 : Maxima d'absorption des spectres UV de $\underline{E}^*$ et $\underline{E}$

	MeOH		NaOMe		AlCl ₃ -AlCl ₃ /HCl	
	$\lambda_{\max}$ I	$\lambda_{\max}$ II	$\Delta\lambda_{\max}$ I	$\Delta\lambda_{\max}$ II	$\Delta\lambda_{\max}$ I	$\Delta\lambda_{\max}$ II
$\underline{E}^*$	325	272	45	8	47	18
$\underline{E}$	335	272	45	6	37	10

Les spectres UV montrent que les substances $\underline{E}$ et $\underline{E}^*$ ne sont pas identiques. Ne disposant que de quelques mg de substance $\underline{E}^*$, nous ne pouvons, pour le moment, tirer davantage de renseignements quant à la structure de $\underline{E}^*$; nous dirons simplement qu'il s'agit d'un glycoside flavonique qui n'a pas été repéré dans les autres espèces étudiées.

5.7. Analyse comparative de D

Le chromatogramme des extraits méthanoliques des espèces de la section Coelanthé (fig. 25) montre la présence d'une substance à même R_f que la substance $\underline{D}$ ou gentioside, dans Gentiana punctata, Gentiana pannonica et Gentiana burserii.

A partir de l'extrait méthanolique de Gentiana punctata, nous avons obtenu cette substance chromatographiquement

pure, sous forme de microcristaux jaune pâle fondant à 210-212°C. La substance isolée n'est probablement pas identique à D car le gentioside (dihydroxy-1,7-O-primevérosyl-3-xanthone) fond à 266-267°C [19]. Nous la désignerons par la lettre D'. L'étude des spectres UV permet de tirer les renseignements suivants :

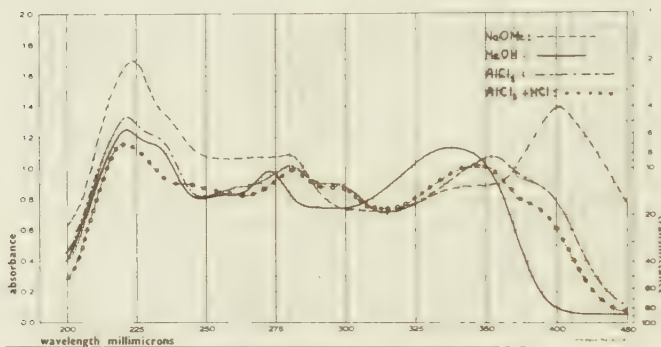


Fig. 32 : Spectre UV de D' dans le méthanol.

Tableau 18 : Maxima d'absorption des spectres UV de D'

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH		339		272
+AlCl ₃	~ 380	352	~ 297	280
+AlCl ₃ /HCl	~ 380	350	~ 297	281
+NaOMe		400		281

Tableau 19 : Maxima d'absorption des spectres UV de D [19]

Solvant	Maxima [nm]			
EtOH	371	303	260	236
+AlCl ₃	426	325	317	275 232
+EtONa	394		317	272 232

Les spectres UV de D' montrent que cette substance est de nature flavonique alors que D est une xanthone. Elle possède probablement des groupes hydroxyles libres en 5, évent. 7 et 4'.

L'hydrolyse acide prolongée (chauffage à reflux avec HCl 2 N pendant 24 heures) ne provoque aucune modification de la substance. Il en est de même par chauffage avec HCl 5 N. Comme la valeur R_f élevée (CCM Polyamide, MeOH-H₂O (9:1) : $R_f = 0,57$) nous suggère que D' est un glycoside, il ne peut s'agir vraisemblablement que d'un 6,8-di-C-glycoside. En effet, si D' était un O-glycoside, nous aurions observé la disparition du spot initial et l'apparition d'un nouveau spot à R_f plus bas. De même, si D' était un mono-C-glycoside, nous aurions observé l'isomérisation des 5-hydroxy-flavones due à la transposition de Wessely-Moser [24].

Les sucres sont certainement identiques, car d'après SEIKEL [34], KOEPPE [35] et WAGNER [36], les 6,8-di-C-glycosides possédant des sucres différents et un groupe hydroxyle libre en position 5 s'isomérisent lors du traitement par les acides minéraux à chaud. Afin d'obtenir davantage de renseignements sur la nature de cette substance extrêmement intéressante, nous avons effectué l'hydrolyse de D' par l'acide iodhydrique en présence de phénol (voir partie expérimentale), qui permet de rompre la liaison C-C reliant le sucre

au squelette flavonique [37]. Lors du traitement à l'acide iodhydrique, la molécule de sucre est entièrement détruite et il faut également tenir compte du fait que des groupes méthoxyles, par exemple, sont complètement déméthylés dans ces conditions.

La figure 33 montre le comportement chromatographique de la substance D', avant et après traitement à l'acide iodhydrique.

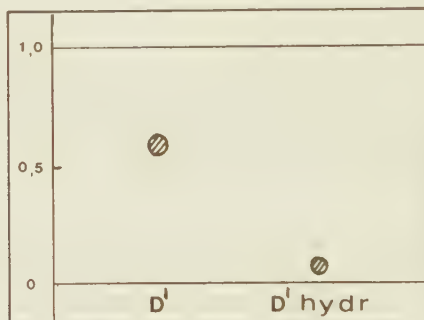


Fig. 33 : Chromatogramme de D' et D' hydrolysé
Polyamide Merck, MeOH-H₂O (9:1), Rév.: UV 350 nm.

La substance D' hydrolysée a été purifiée par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20 avec le méthanol comme éluant. Le spectre UV est représenté dans la figure 34.

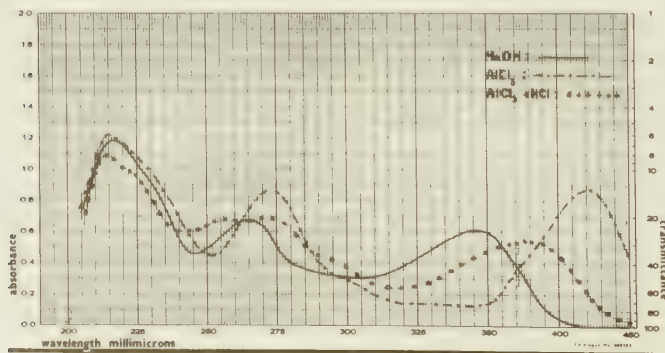


Fig. 34 : Spectre UV de D' hydrolysé par HI dans le MeOH.

Tableau 20 : Maxima d'absorption des spectres UV de
D' hydrolysé

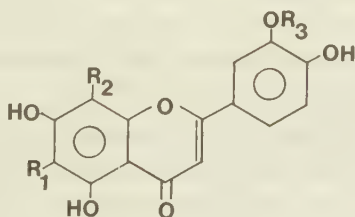
Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	348	~291	267	253
+AlCl ₃	426	~326	~300	274
+AlCl ₃ /HCl	382	356	~295	275
+NaOMe	400	~329	266	

Les spectres UV de D' hydrolysé correspondent aux spectres UV de la lutéoline (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone) [23]. Il en est de même des comportements chromatographiques.

Si l'on compare les spectres UV de D' avant et après l'hydrolyse par HI, on constate que la position 3' doit être substituée.

Par conséquent, la structure de D' est probablement la suivante :

$R_1 = R_2 = \text{glycosyle}$
 $R_3 = \text{inconnu}$



La nature des sucres, ainsi que le substituant R_3 ne pourront être établis que par une étude des spectres RMN. Toutefois, on peut certainement affirmer que R_3 n'est pas de nature glycosidique, sinon l'hydrolyse avec HCl aurait été possible.

La substance D' est également présente, en quantité plus faible, dans les feuilles de Gentiana pannonica. (Mêmes R_F , mêmes comportements à l'hydrolyse acide, mêmes spectres UV, spectres IR superposables). La figure 35 montre les spectres IR de D' isolé à partir de Gentiana punctata et de D' isolé à partir de Gentiana pannonica.

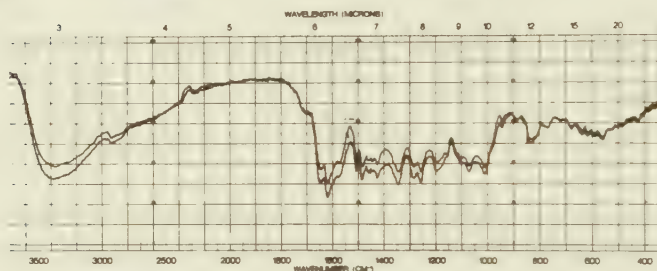


Fig. 35 : Spectres IR de D' (Punctata) et de D' (Pannonica) dans KBr.

La présence de D' est probable dans les feuilles de Gentiana burserii, (comportement chromatographique et comportement à l'hydrolyse acide) mais pas certaine, car nous n'avons pas pu isoler D' en quantité suffisante pour enregistrer les spectres UV et IR. En revanche, nous concluons à son absence dans les autres espèces étudiées.

L'isolement de la substance D' devra être entreprise à plus grande échelle à partir de Gentiana punctata afin d'établir si D' est un di-C-glycoside nouveau ou l'un des rares di-C-glycosides décrits dans la littérature [38].

5.8. Analyse comparative de C

La substance C (isovitexine) se trouve en concentration très faible dans toutes les espèces étudiées. Ce n'est qu'à partir de Gentiana punctata que nous avons pu isoler suffisamment de substance pure (10 mg pour 100 g de feuilles séchées) pour en enregistrer les spectres IR et UV.

La figure 36 montre le spectre IR de C isolé à partir de Gentiana punctata.

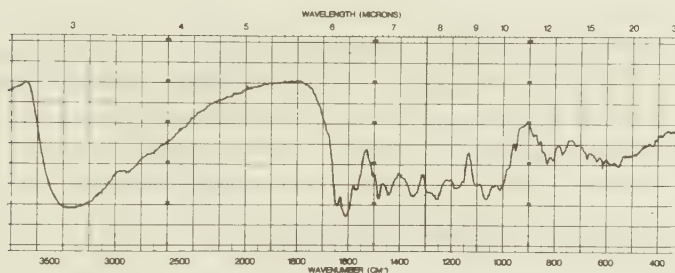


Fig. 36 : Spectre IR de C isolé à partir de Gentiana punctata, dans KBr.

Ce spectre correspond à celui de l'isovitexine [28].

Les spectres UV de C isolé à partir de Gentiana punctata et à partir de Gentiana pannonica sont identiques et correspondent à ceux de l'isovitexine décrits dans la littérature [23].

Pour les autres espèces, nous n'avons pas pu isoler C à l'état pur. Cependant, le comportement chromatographique correspond à celui de l'isovitexine :

CCM, Polyamide Merck, MeOH-H₂O (9:1) : $R_F = 0,38$

CCM, Cellulose Merck, AcOH 15% : $R_F = 0,40$

De plus, dans chaque cas, le traitement par l'acide chlorhydrique provoque une isomérisation. Le nouveau spot correspond à la vitexine (voir fig. 21).

Bien que nous n'ayons pas apporté la preuve absolue de la présence de la substance C dans toutes les espèces étudiées, nous pensons que C est présent dans toute la section, car dans toutes les espèces nous avons montré la présence de la substance F (glucoside en 4' de la substance C).

5.9. Analyse comparative de B

La substance B (isoorientine), comme le montre la figure 25, semble se trouver dans les extraits méthanoliques de toutes les espèces étudiées. Selon le schéma général d'isolement (fig. 26), nous avons pu l'obtenir chromatographiquement pure à partir de tous les extraits. La concentration est de l'ordre de 40-100 mg pour 100 g de feuilles sèches.

La comparaison a été effectuée avec un échantillon authentique isolé par BELLMANN [19] à partir des feuilles de Gentiana lutea.

Le comportement chromatographique est le même dans chaque cas :

CCM, Polyamide Merck, MeOH-H₂O (8:2) : $R_f = 0,30$

CCM, Cellulose Merck, AcOH 15% : $R_f = 0,23$

Le traitement par l'acide chlorhydrique produit l'isomérisation : apparition d'un nouveau spot correspondant à l'orientine (voir fig. 10).

Enfin, les spectres UV dans MeOH, effectués en présence des réactifs habituels sont identiques et les spectres IR rigoureusement superposables. A titre d'exemple, la figure 37 représente les spectres IR du témoin et de B isolé à partir des feuilles de Gentiana burseri.

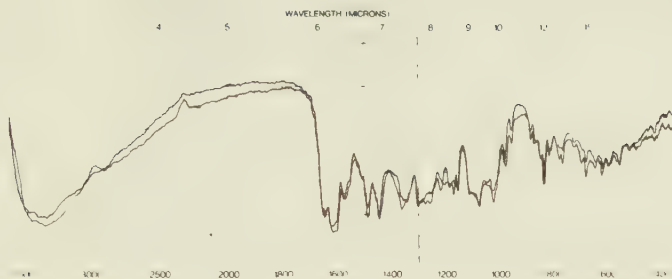


Fig. 37 : Spectres IR de l'isoorientine et de B isolé
à partir de Gentiana burseri.

Ainsi, la distribution de la substance B est générale dans toute la section. Cela n'est pas étonnant, car nous avons montré (voir § 5.6) que le 4'-glucoside de B est également présent dans toutes les espèces étudiées.

5.10. Analyse comparative de G

Le chromatogramme des extraits méthanoliques des espèces étudiées (voir fig. 25) montre la présence d'un spot à R_f plus bas que B dans Gentiana punctata, Gentiana pannonica et Gentiana burseri. L'isolement et la purification de cette substance G sont rendus particulièrement difficiles du fait de la très faible concentration de cette substance dans les plantes en question. Il a cependant été possible d'isoler suffisamment de produit pour enregistrer les spectres UV. La figure 38 montre les spectres UV de G isolé à partir de Gentiana burseri.

Le spectre de G est typique d'une flavone possédant un groupe ortho-dihydroxyle, ainsi que des groupes hydroxyles libres en position 5, 7 et 4'.

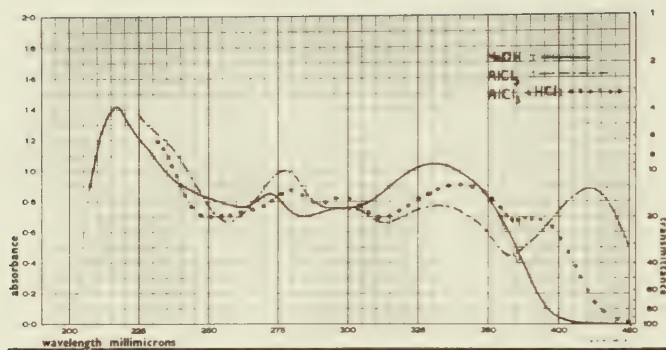


Fig. 38 : Spectres UV de G isolé à partir de Gentiana burseri , dans le méthanol.

Les spectres UV de G isolé à partir de Gentiana punctata ou à partir de Gentiana pannonica sont légèrement différents du spectre ci-dessus, les différences étant probablement dues à la présence d'impuretés (notamment la substance B).

Nous pensons que G (burseri), G (punctata) et G (pannonica) sont identiques; toutefois, les indices que nous possédons ne sont pas suffisants pour l'affirmer.

5.11. Résumé et conclusion

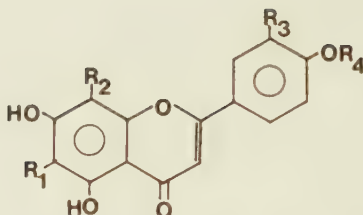
La répartition des substances isolées dans les espèces de la section Coelanthé est résumée dans le tableau 21.

Le tableau 21 montre que les xanthones ne sont présentes que dans les feuilles de Gentiana lutea. En revanche, les C-glucosides isoorientine (B) et isovitexine (C), ainsi que leurs O-glucosides en 4', respectivement E et F, sont présents dans toutes les espèces de la section. La répartition du (+)-bornésitol est également uniforme à l'intérieur

Tableau 21 : Substances présentes dans les différentes espèces de la section Coelanthe

	<u>G. lutea</u>	<u>G. purpurea</u>	<u>G. punctata</u>	<u>G. pannonica</u>	<u>G. villarsii</u>	<u>G. burserii</u>
bornésitol	+	+	+	+	+	+
<u>F</u>	+	+	+	+	+	+
<u>E</u>	+	+	+	+	+	+
<u>D</u>	+					
<u>D'</u>			+	+		(+)
<u>C</u>	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)
<u>B</u>	+	+	+	+	+	+
<u>A</u>	+					
<u>A₁</u>	+					
<u>G</u>			+	(+)		(+)
<u>E</u> [*]						+

(+) = présence probable

Flavones

F : $R_1 = R_4 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

E : $R_1 = R_4 = \text{glucosyle}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

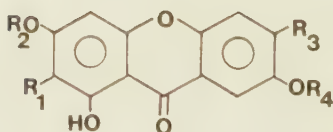
D' : $R_1 = R_2 = \text{glycosyle}$, R_3 : inconnu, $R_4 = \text{H}$

C : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$

B : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

G : R_1, R_2, R_3 : inconnus, $R_4 = \text{H}$

E* : glycoside flavonique inconnu

Xanthones

A : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

A1 : $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{CH}_3$

D : $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{primevérosyle}$, $R_4 = \text{CH}_3$

de la section. De plus, les espèces punctata, pannonica et burseri se distinguent par la présence de 2 flavones dont la structure n'est pas encore établie. Relevons encore que dans l'espèce burseri, nous avons isolé une substance flavonique nouvelle E^{*} non identifiée. Enfin, la concentration en substance E est particulièrement élevée dans Gentiana villarsii, de l'ordre de 400 mg pour 100 g de feuilles séchées.

Il est assez surprenant de constater l'absence de xanthones dans les feuilles des espèces étudiées, ces dernières substances constituant une des caractéristiques du genre Gentiana. Cependant, signalons à ce propos que les nombreuses xanthones identifiées dans le genre Gentiana (voir tableau 2) ont été isolées à partir des racines et non des feuilles. Il serait extrêmement intéressant d'entreprendre l'isolement des composés phénoliques à partir des racines des différentes espèces de la section Coelanthé, afin de montrer si ces dernières se distinguent par la présence de xanthones ou par la présence des C-glucosides flavoniques que nous venons de mettre en évidence dans les feuilles.

Enfin, mentionnons que cette étude de phytochimie comparée a montré une fois de plus qu'il est très dangereux de comparer les espèces en se basant uniquement sur le comportement chromatographique des substances recherchées. Pour certains glycosides, même la comparaison des spectres IR n'est pas suffisante pour affirmer l'identité de 2 substances !

Bien entendu, nous ne prétendons pas que cette étude de phytochimie comparée soit complète. En effet, si nous pouvons conclure dans beaucoup de cas à la présence certaine de telle ou telle substance, ou à l'absence d'autres, il ne nous est pas possible pour l'instant de conclure en ce qui concerne la substance nouvellement isolée E^{*}. Il se pourrait qu'elle se trouve en traces également dans d'autres espèces.

6. ETUDE DES COMPOSES XANTHONIQUES DANS LES FEUILLES DE GENTIANA BAVARICA L.

Parallèlement à l'étude systématique de toutes les espèces de la section Coelanthé, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude d'une autre section du genre Gentiana et cela dans le dessein d'établir si les substances nouvellement isolées pouvaient être considérées comme caractéristiques de la section Coelanthé ou si on les retrouvait dans d'autres sections.

Le travail de CRELEROT [1] nous a incité à aborder l'étude de la section Cyclostigma qui compte une dizaine d'espèces. Notre choix s'est porté sur Gentiana bavarica L. parce que cette espèce n'a jamais été étudiée, et également parce qu'elle est assez fréquente dans les Alpes. A part quelques travaux sur les racines de Gentiana verna (voir tableau 2), aucune espèce de la section Cyclostigma n'a fait l'objet d'investigations chimiques. Gentiana bavarica est une petite gentiane bleue qui pousse dans les lieux très humides : combes à neige, bord des ruisseaux, marais.

Afin de ne causer aucune déprédation à la nature, le matériel végétal utilisé pour notre étude est de provenance diverse :

- Barberine, Valais, alt. 2000 m
- Montagne de Fully, Valais, alt. 2150 m
- Col du Simplon, Valais, alt. 2100 m
- Jochpass, Obwalden, alt. 2400 m
- Gurschenalp, Uri, alt. 1970 m

6.1. Isolement des composés

Après divers essais d'extraction, nous avons retenu la méthode que nous avons mise au point pour l'isolement des composés

phénoliques à partir de feuilles de Gentiana lutea, à savoir, l'extraction à chaud, à partir de matériel séché, par des solvants à polarité croissante : ligroïne, éther, acétate d'éthyle, méthanol (voir fig. 2).

L'extraction a été entreprise avec 150 g de matériel séché (feuilles + tiges). Les différents extraits obtenus ont été analysés par chromatographie sur couches minces de polyamide. Le système MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5) [23] donne un aperçu général des polyphénols présents.

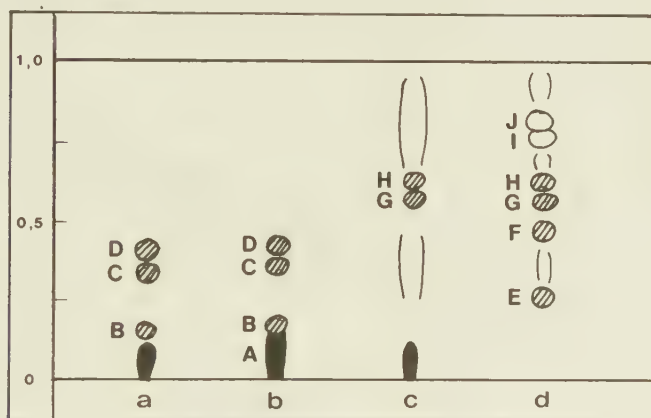


Fig. 39 : Chromatogramme des différents extraits de Gentiana bavarica.

Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)

Rév. : UV 350 nm

●: brun

a) extrait ligroïnique

●: rouge

b) extrait étheré

○: bleu clair

c) extrait à l'acétate d'éthyle

d) extrait méthanolique

Le chromatogramme ci-dessus montre la présence de 10 spots qui pourraient être de nature flavonique ou xanthonique, que nous désignons par les lettres A - J. Dans l'extrait

ligroïnique, se trouvent les substances B, C et D que l'on trouve encore, mais en très faible concentration, dans l'extrait étheré. Ce dernier montre la présence de la substance A, presque entièrement masquée par la chlorophylle. L'extrait à l'acétate d'éthyle contient en plus de beaucoup d'impuretés, les substances G et H, que l'on retrouve, en concentration plus grande, dans l'extrait méthanolique, avec les substances E, F, I et J.

La figure 40 représente le chromatogramme des extraits ligroïniques et étherés sur couches minces de polyamide (solvant benzène - méthanol - acide acétique, 45:32:16) qui permet une bonne séparation des spots de R_f inférieurs.

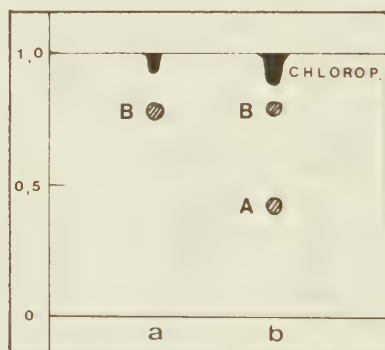


Fig. 40 : Chromatogramme des extraits ligroïniques et étherés de Gentiana bavarica.

Polyamide Merck, C_6H_6 -MeOH-AcOH (45:32:16)

Rév.: UV 350 nm.

Le système de solvant choisi permet une excellente séparation de la substance A puisque la chlorophylle migre au front.

L'isolement des différents composés ainsi mis en évidence a été effectuée par chromatographie préparative sur colonne de polyamide à partir des extraits ligroïnique, étheré et méthanolique.

La figure 41 en donne le schéma général :

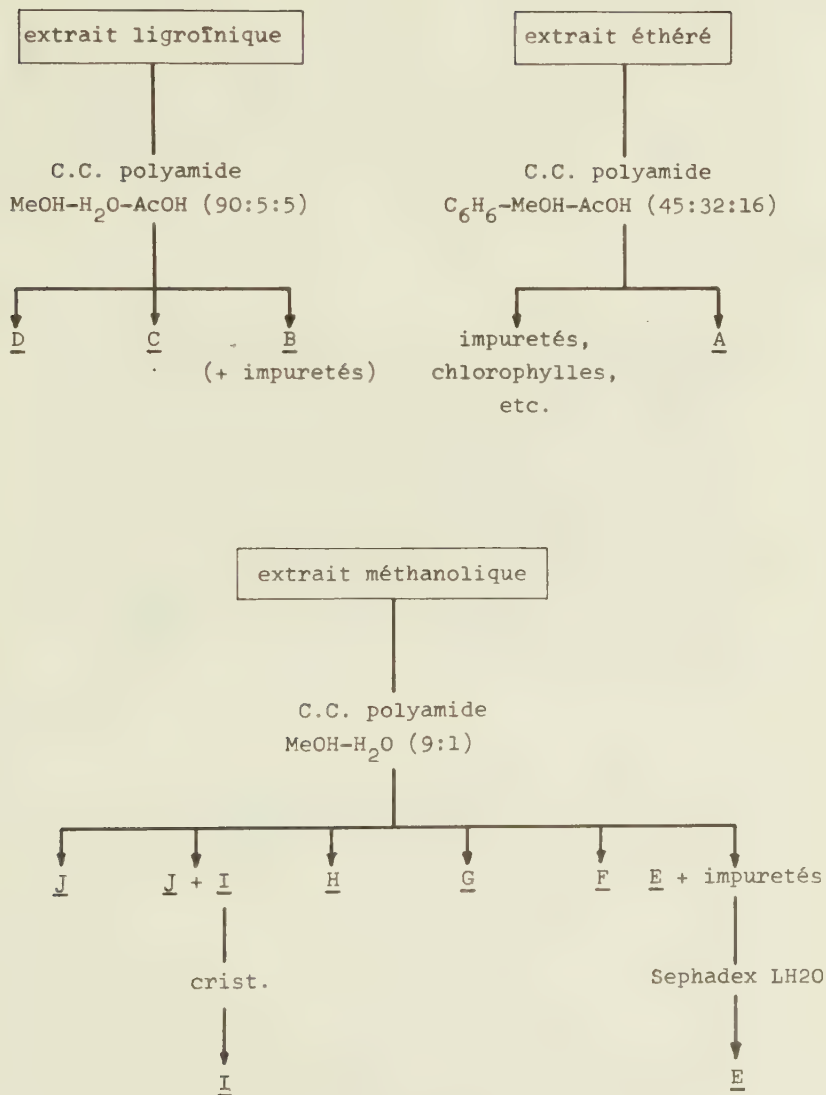


Fig. 41 : Schéma général d'isolement

6.2. Identification de D

Isolée à partir de l'extrait ligroïnique, selon le schéma de la figure 41, la substance D a été purifiée par recristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol (1:1). Nous avons obtenu 75 mg de cristaux jaunes en forme d'aiguilles fondant à 159°C. L'étude des spectres UV permet de tirer les renseignements suivants :

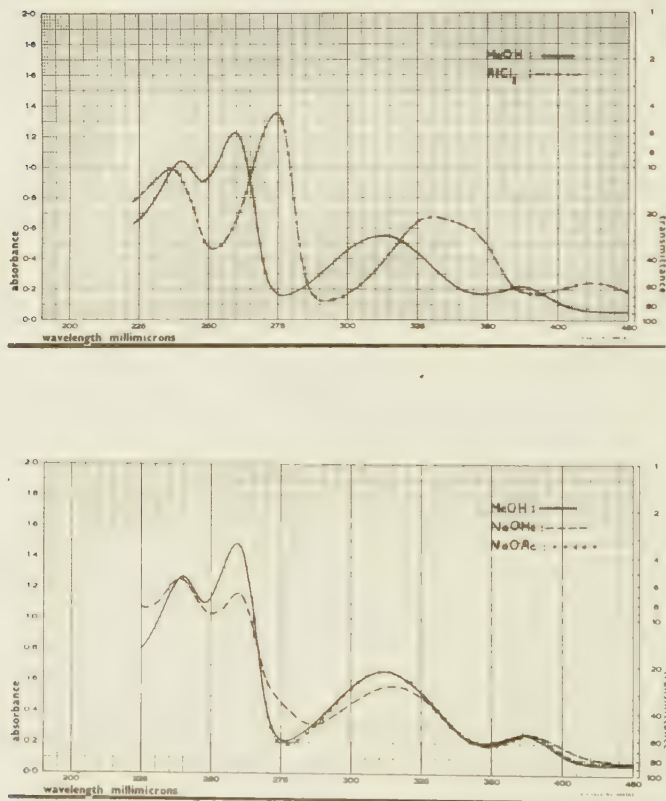


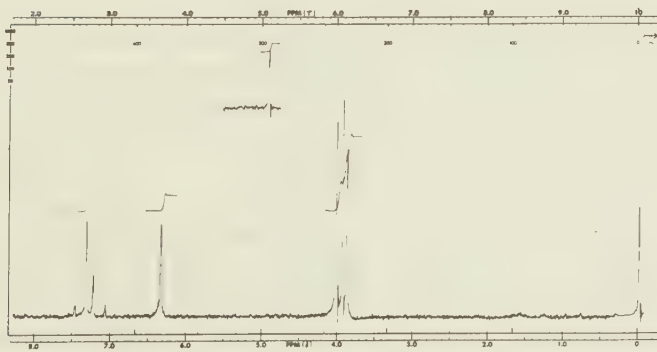
Fig. 42 : Spectres UV de D dans le méthanol.

Tableau 22 : Maxima d'absorption des spectres UV de D

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	374	312	261	240
+AlCl ₃	425	330	275	238
+AlCl ₃ +HCl		330	275	238
+NaOAc	374	312	261	240
+NaOMe	374	316	261	240

Le spectre UV de D est caractéristique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle en position 1 (ou 8) [39]. La modification très légère de l'allure du spectre par l'addition de NaOMe semble indiquer qu'il n'y a pas d'autres groupes hydroxyles libres.

Le spectre RMN de D dans le CDCl₃ est représenté dans la figure 43.

**Fig. 43** : Spectre RMN de D dans le CDCl₃.

On constate la présence de 3 singulets à 3,90 , 3,94 et 4,02 ppm correspondant à 3 groupes méthoxyles. Les signaux aromatiques apparaissent à 6,33 ppm : 2 protons sous forme de singulet (système AB complètement "overlapped") et à 7,16 et 7,35 ppm, 2 protons (spectre AB, constante de couplage ortho $J = 9,5$ cps). Enfin, à 13,25 ppm, se trouve un singulet correspondant à un groupe hydroxyle fortement déblindé par la fonction carbonyle. D'autre part, l'absence de signal dans la région de 7,5 ppm, indique que les positions 1 et 8 sont substituées [40]. Afin d'obtenir davantage de renseignements sur la nature de D, nous avons préparé son dérivé acétylé (voir partie expérimentale) : cristaux blancs en forme d'aiguilles fondant à 178°C. La figure 44 montre le spectre RMN de D acétylé.

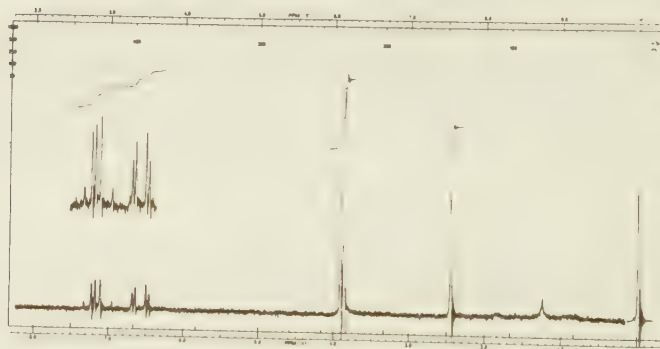


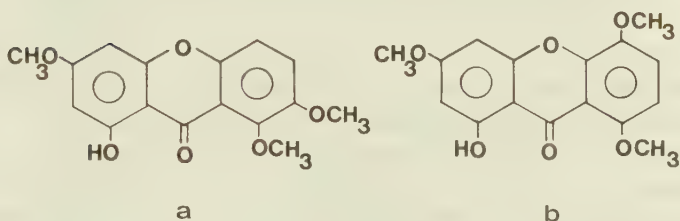
Fig. 44 : Spectre RMN de D acétylé.

Le groupe acétoxyle apparaît sous forme d'un singulet à 2,48 ppm, position 1 (ou 8), confirmant ainsi le voisinage de la fonction carbonyle [21]. Deux singulets à 3,87 ppm (6H) et 3,92 ppm (3H) correspondent aux 3 groupes méthoxyles. Deux protons aromatiques apparaissent à 6,50 et 6,64 ppm (spectre AB; constante de couplage $J = 2,5$ cps correspondant à $J_{\text{méta}}$). Les 2 autres protons aromatiques forment également

un spectre AB à 7,08 ppm et à 7,23 ppm (constante de couplage $J_{ortho} = 9,5$ cps).

La comparaison des spectres RMN de D et de son dérivé acétylé montre que seuls les protons aromatiques en méta sont déplacés.

Ainsi, la substance D est une hydroxy-triméthoxy-xanthone. Les positions 1 et 8 sont substituées; les 2 structures possibles sont les suivantes :



a) hydroxy-1 triméthoxy-3,7,8 xanthone

b) hydroxy-1 triméthoxy-3,5,8 xanthone

Or, les xanthonnes substituées en 1,3,7,8 ont des spectres différents de celles substituées en 1,3,5,8 [41].

Le spectre UV de la substance D est identique à celui de a) [12][42]. Il en est de même des spectres RMN de D et de a), ainsi que des spectres RMN de leurs dérivés acétylés respectifs [12][42]. Par conséquent, la substance D est identique à a) : hydroxy-1 triméthoxy-3,7,8 xanthone.

La figure 45 montre le spectre IR de D.

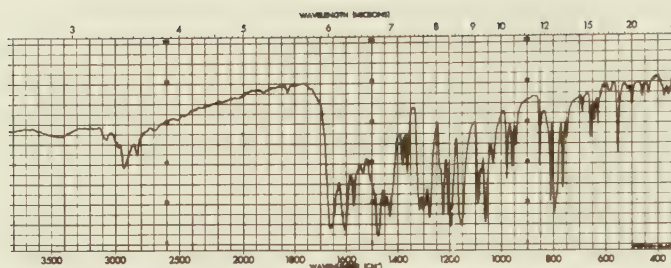


Fig. 45 : Spectre IR de D dans KBr.

La substance isolée est connue sous le nom de décussatine. Elle a été décelée pour la première fois par DALAL & COLL. en 1953 dans Swertia decussata (Gentianacées) [43]. Cependant, ces auteurs l'ont décrite comme l'hydroxy-8 triméthoxy-1,3,7 xanthone. En 1969, RIVAILLE & COLL. [12], en préparant l'hydroxy-8 triméthoxy-1,3,7 xanthone ont constaté que les propriétés de cette dernière substance étaient différentes de celles de la décussatine naturelle. Pour élucider ce point, ils ont répété l'extraction de la décussatine de Swertia decussata selon la technique de DALAL [43] et ont établi sa structure comme étant l'hydroxy-1-triméthoxy-3,7,8 xanthone. En 1969, également, STOUT & COLL. [42] ont identifié l'hydroxy-1 triméthoxy-3,7,8 xanthone dans les racines de Macrocarpaea glabra (Gentianacées). Le point de fusion indiqué par ces auteurs est de 158-160°C, alors que RIVAILLE [12] observe 151°C. Rappelons que le point de fusion de D est de 159°C.

Il est intéressant de remarquer que la décussatine n'a jusqu'ici été identifiée que dans la famille des Gentianacées, à savoir, dans les racines de Canscora decussata [44], dans les racines de Gentiana verna (section Cyclostigma) [15] et dans les feuilles de Gentiana Kochiana [12].

6.3. Identification de C

Par chromatographie préparative de l'extrait ligroïnique sur colonne de polyamide avec le solvant MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5), nous avons obtenu la substance C chromatographiquement pure. Après recristallisation dans le méthanol, son point de fusion est de 194°C, aiguilles jaunes. Quantité isolée : 90 mg.

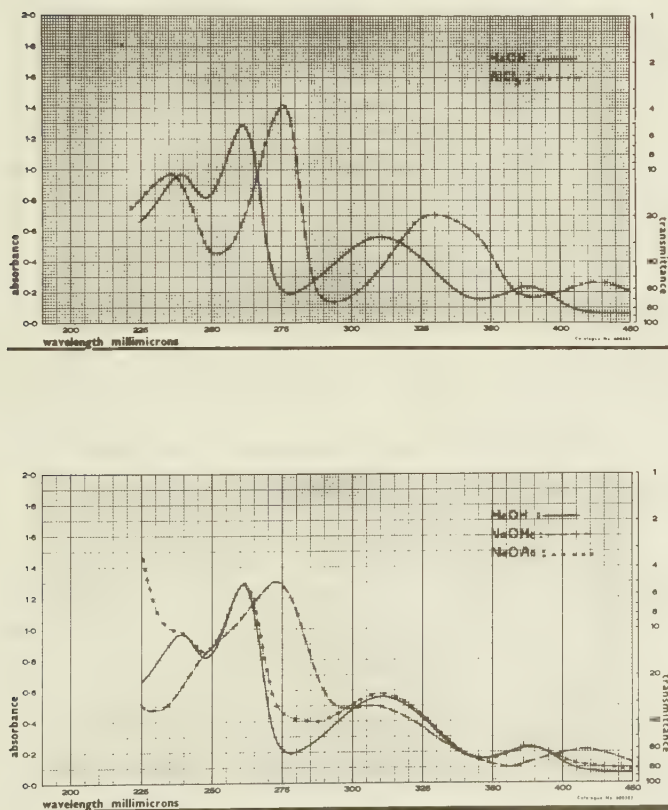
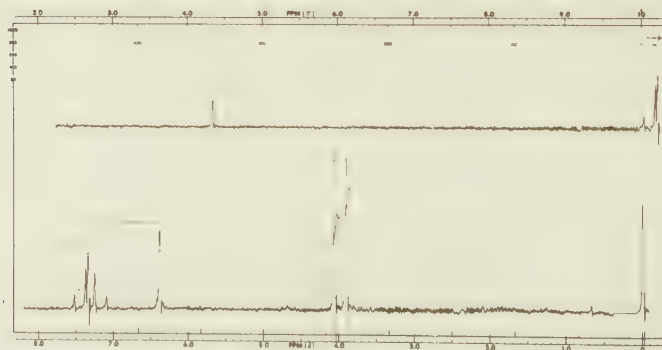


Fig. 46 : Spectres UV de C dans le méthanol.

Tableau 42 : Maxima d'absorption des spectres UV de C

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	375	311	261	239
+AlCl ₃	428	330	276	236
+AlCl ₃ HCl	428	330	276	236
+NaOAc	375	311	261	239
+NaOMe	418	310	273	

Le spectre UV de C est caractéristique d'une xanthone substituée en 1,3,7,8 [41]. L'addition de AlCl₃ provoque un déplacement bathochrome important de toutes les bandes, dû à la présence probable d'un groupe hydroxyle en 1 (ou 8). L'addition de NaOAc ne modifie pas l'allure du spectre; par contre, NaOMe provoque un déplacement bathochrome de toutes les bandes : présence probable d'un hydroxyle libre en position 7.

Fig. 47 : Spectre RMN de C dans CDCl₃

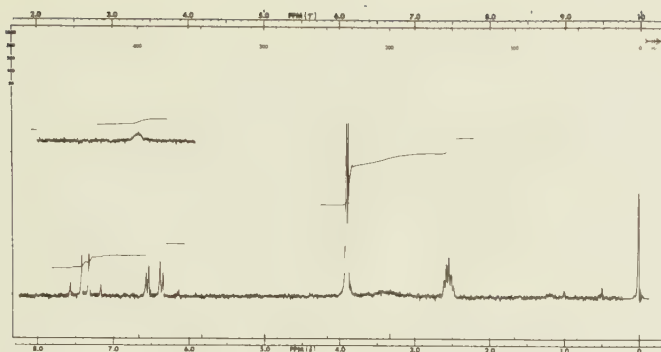


Fig. 48 : Spectre RMN de C dans DMSO.

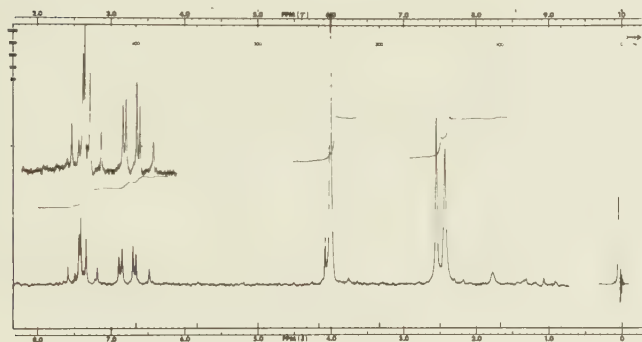


Fig. 49 : Spectre RMN de C acétylé dans CDCl_3 .

L'étude des spectres RMN de C et de son dérivé acétylé permet de tirer les renseignements suivants : le spectre du dérivé acétylé montre la présence de 4 protons aromatiques, de 2 groupes acétoxyles dont l'un au voisinage de la fonction carbonyle et de 2 groupes méthoxyles. La substance C est donc une dihydroxy-diméthoxy-xanthone. La position des divers substituants peut être déterminée par la comparaison des déplacements chimiques des protons aromatiques des différents spectres de C, ainsi que de ceux de la décussatine.

Tableau 43 : Spectres RMN de $\underline{\text{C}}$ dans DMSO, de $\underline{\text{C}}$, de $\underline{\text{C}}$ acétylé, de décussatine et de décussatine acétylée dans CDCl_3
(δ en ppm par rapport au T.M.S. pris comme référence interne)

Xanthones	H_2 et H_4		H_5 et H_6	
	H_2	H_4	H_5	H_6
$\underline{\text{C}}$ (DMSO)	type AB $J = 2,5$ cps	6,35 6,57	type AB $J = 9,5$ cps	7,26 7,48
$\underline{\text{C}}$ (CDCl_3)	type A_2	6,37 6,37	type AB $J = 9,5$ cps	7,20 7,40
$\underline{\text{C}}$ acétylé (CDCl_3)	type AB $J = 2,5$ cps	6,64 6,73	type AB $J = 9,5$ cps	7,24 7,38
décussatine (CDCl_3)	type A_2	6,33 6,33	type AB $J = 9,5$ cps	7,16 7,35
décussatine acétylée (CDCl_3)	type AB $J = 2,5$ cps	6,50 6,64	type AB $J = 9,5$ cps	7,08 7,23

Le spectre RMN de C dans DMSO montre l'effet de la liaison H intermoléculaire avec le solvant [46]. Les protons qui sont le plus influencés sont H_2 et H_6 qui se trouvent dans le voisinage immédiat des groupes hydroxyles. On observe, en effet, un déplacement de 0,20 et 0,08 ppm respectivement par rapport au spectre dans $CDCl_3$. L'important déplacement pour le proton H_2 transforme le spectre du type A_2 (dans $CDCl_3$) en un spectre AB duquel on peut déduire immédiatement les déplacements des 2 protons (H_2 et H_4), ainsi que la constante de couplage : $J_{H_2-H_4} = 2,5$.

L'examen du δ des acétoxyles de C acétylé indique que l'un des OH se trouve probablement en position 1, l'autre en 3 ou 7. La comparaison avec le spectre de la décussatine acétylée permet d'exclure la possibilité d'une substitution en 3, puisque les protons en 2 et 4 ne sont pratiquement pas déplacés (voir tableau 43). La substance D est ainsi identique à la dihydroxy-1,7 diméthoxy-3,8 xanthone. Les spectres UV, RMN, ainsi que le point de fusion, correspondent aux données de la littérature [11][12].

La structure de la dihydroxy-1,7 diméthoxy-3,8 xanthone a été établie par PLOUVIER [11] en 1967. Cet auteur l'a isolée à partir de Gentiana acaulis et lui a donné le nom de gentiacauléine. La gentiacauléine a également été isolée à partir des racines et des feuilles de Gentiana Kochiana [11][12].

La figure 50 représente le spectre IR de C.

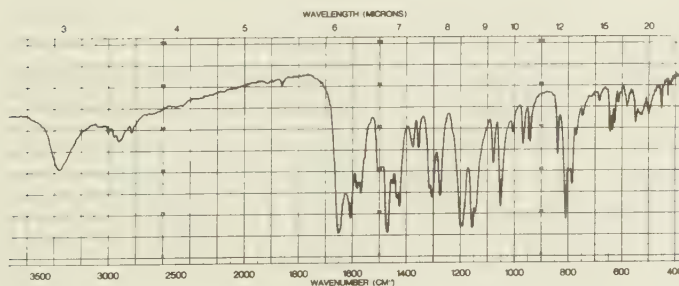
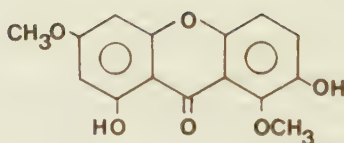


Fig. 50 : Spectre IR de C dans KBr.



C : dihydroxy-1,7 diméthoxy-3,8 xanthone (gentiacauléine)

6.4. Identification de B

Cette substance est isolée à partir de l'extrait ligroïni- que selon le schéma de la figure 41. Elle est purifiée par cristallisation dans l'éthanol. Aiguilles jaunes, F.: 224-225°C. Quantité isolée : 20 mg.

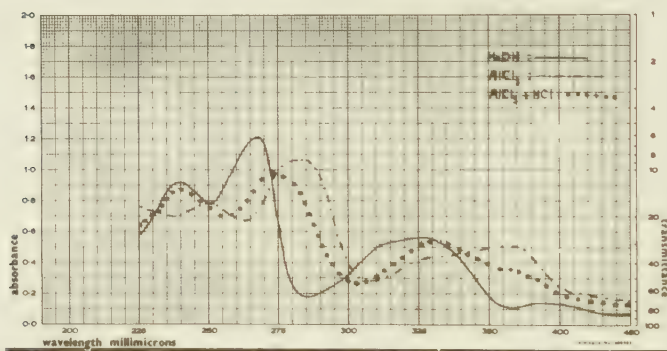


Fig. 51 : Spectres UV de B dans le méthanol.

Tableau 44 : Maxima d'absorption des spectres UV de B

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	383	325	267	234
+AlCl ₃	430	350	278	246
+AlCl ₃ /HCl	360	330	272	240

Le spectre UV est caractéristique d'une xanthone substituée en 1,3,7,8 [41]. L'addition de AlCl_3 provoque un déplacement bathochrome important de toutes les bandes : présence d'un OH en 1 ou 8, éventuellement d'un groupe orthodihydroxyle. La présence de ce dernier est confirmée par l'addition de HCl qui se traduit par un déplacement hypsochrome de toutes les bandes.

L'acétylation de B conduit à un dérivé incolore fondant à 187°C . Le spectre RMN de B acétylé est reproduit dans la figure 52.

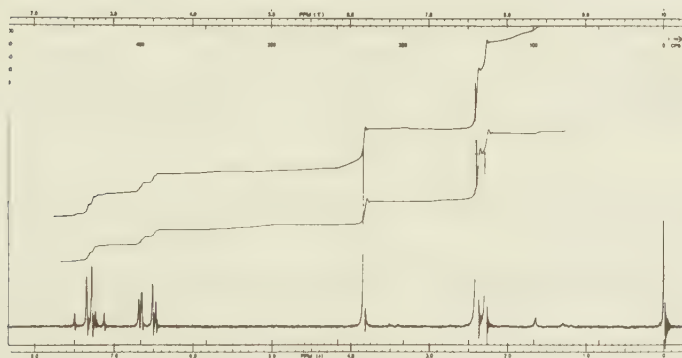


Fig. 52 : Spectre RMN de B acétylé.

Le spectre du dérivé acétylé montre la présence d'un méthoxyle et de 3 acétoxyes, dont deux à 2,40 et 2,41 ppm. Ce déplacement chimique particulièrement élevé indique qu'ils se trouvent au voisinage du carbonyle, c'est-à-dire en position 1 et 8 [21]. Le méthoxyle peut donc se trouver, soit en position 3, soit en position 7. La comparaison avec le spectre RMN de la décussatine permet de le fixer en position 3. Le tableau 45 donne les déplacements chimiques des protons aromatiques de B acétylé et de la décussatine acétylée.

Tableau 45 : Protons aromatiques de B acétylé et de la décussatine acétylée
(δ en ppm par rapport au T.M.S. pris comme référence interne)

	H ₂ et H ₄ (J=2,5 cps)	H ₅ et H ₆ (J=9,5 cps)
<u>B</u> acétylé	6,52 6,63	7,24 7,38
acétoxy-1 tri- méthoxy-3,7,8- xanthone	6,50 6,64	7,08 7,23

On constate en effet que les protons en 2 et en 4 ne sont pas déplacés.

La substance B est donc la trihydroxy-1,7,8 méthoxy-3-xanthone.

Les spectres UV, IR, RMN, ainsi que le point de fusion, sont identiques aux données de la littérature [12][45].

La figure 53 représente le spectre IR de B.

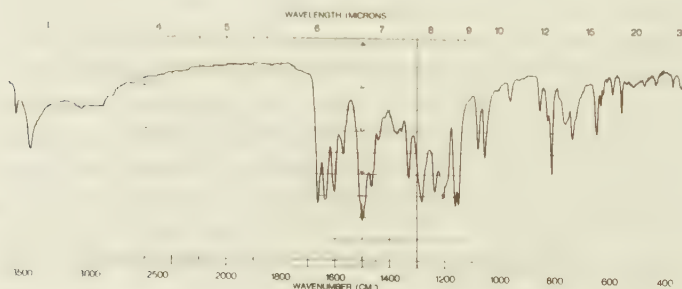
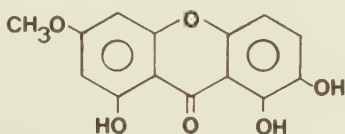


Fig. 53 : Spectre IR de B dans KBr.

La trihydroxy-1,7,8 méthoxy-3 xanthone a été identifiée pour la première fois par GUYOT & COLL. en 1968 dans les feuilles de Gentiana Kochiana [13] et par les mêmes auteurs, en 1969, dans les tiges de Swertia decussata. Ils ont proposé de l'appeler "gentiakochianine". Parallèlement aux travaux mentionnés ci-dessus, KOMATSU [45] l'a isolée à partir des feuilles de Swertia japonica et lui a attribué le nom de "swertianine".



B = trihydroxy-1,7,8 méthoxy-3 xanthone

6.5. Identification de A

Cette substance a été isolée de l'extrait étheré par chromatographie sur colonne de polyamide avec le solvant C_6H_6 -MeOH-AcOH (45:32:16). Après recristallisation dans l'éthanol : aiguilles jaunes très fines, F.: 332-333°C. Quantité isolée : 17 mg. La valeur R_f très faible de cette substance laisse supposer qu'elle possède beaucoup de groupes hydroxyles libres.

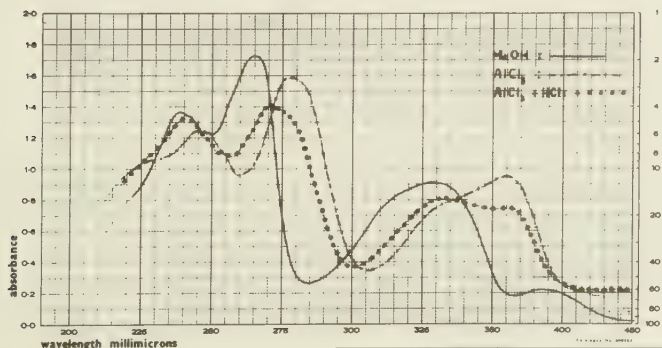


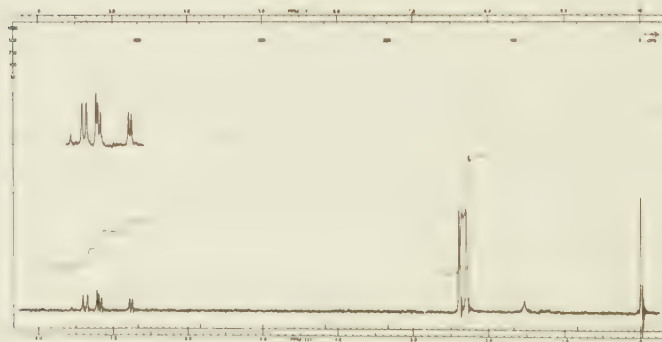
Fig. 54 : Spectres UV de A dans le méthanol.

Tableau 46 : Maxima d'absorption des spectres UV de A

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	385	329	265	238
+AlCl ₃		360	278	244
+AlCl ₃ /HCl	~360	~332	270	240

Le spectre UV de A est caractéristique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle en 1 ou 8, et un groupe o-dihydroxyle. Elle pourrait être substituée en 1,3,7,8 [41].

Le spectre RMN du dérivé acétylé est représenté dans la figure 55.

Fig. 55 : Spectre RMN de A acétylé dans le CDCl₃.

Le spectre ci-dessus montre la présence de 4 groupes acétoxyles et de 4 protons aromatiques. La substance A est donc une tétrahydroxy-xanthone. Un singulet à 2,40 ppm correspond à 2 groupes acétoxyles. Ce déplacement chimique particulièrement élevé indique qu'ils se trouvent au voisinage de la

fonction carbonyle (positions 1 et 8) 21. Un autre singulet à 2,30 ppm correspond aux autres groupes acétoxyles auxquels on peut attribuer les positions 3 et 7. Deux doublets centrés à 6,80 et 7,20 ppm (J 2,3 cps) correspondent aux protons H_5 et H_6 apparaissent à 7,33 et 7,45 ppm (spectre AB, J 10 cps).

La substance A est donc la tétrahydroxy-1,3,7,8 xanthone.

Les spectres UV, IR, NMR, ainsi que le point de fusion, sont identiques aux données de la littérature [12][45].

Le spectre IR de A est représenté dans la figure 56.

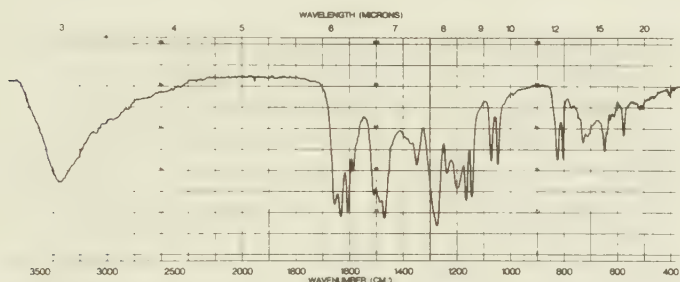
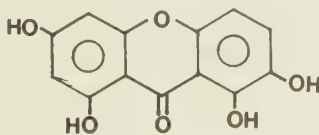


Fig. 56 : Spectre IR de A dans KBr.

Le premier isolement de la tétrahydroxy-1,3,7,8 xanthone, à partir de *Swertia japonica*, est signalé par KOMATSU [45], qui l'appelle "norswertianine". Elle a également été isolée à partir des racines de *Canscora decussata* (Gentianacées) par CHAUDHURI & GHOSAL [44]. Mentionnons qu'elle a été préparée par déméthylation de la décussatine [43].



A : tétrahydroxy-1,3,7,8 xanthone.

6.6. Identification de J

La substance J est isolée par cristallisation à partir de la première fraction issue de la chromatographie préparative sur colonne de polyamide de l'extrait méthanolique avec le solvant MeOH-H₂O (9:1) (voir fig. 41). Elle est purifiée par recristallisation dans MeOH. F.: 192-193°C (décomp.), microcristaux jaune pâle-blanc. Quantité isolée : 105 mg.

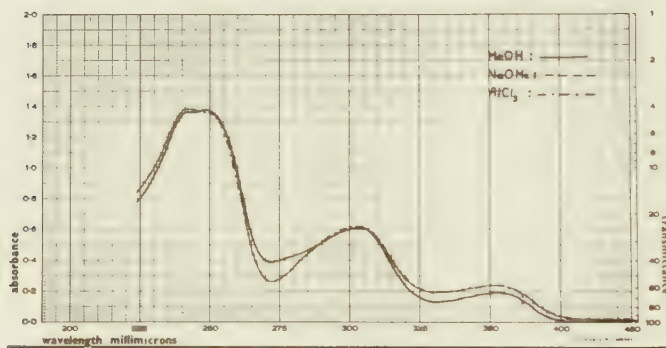


Fig. 57 : Spectres UV de J dans le méthanol.

Tableau 47 : Maxima d'absorption des spectres UV de J

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	355	304	250	242
+AlCl ₃	355	304	250	242
+NaOMe	355	304	250	242

Le spectre UV de J est caractéristique d'une xanthone. L'addition de AlCl_3 ne modifie pas l'allure du spectre. Il en est de même pour l'addition de NaOMe . La substance J ne possède donc aucun groupe hydroxyle libre.

La valeur R_f particulièrement élevée laisse supposer que J est probablement un glycoside. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué l'hydrolyse acide (voir partie expérimentale). Le comportement chromatographique de J, avant et après hydrolyse, est indiqué dans la figure 58.

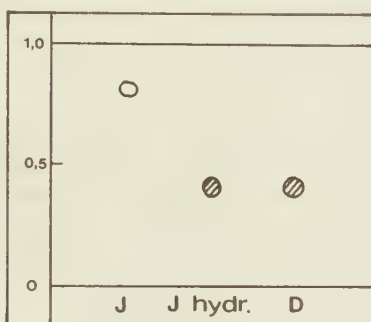


Fig. 58 : Chromatogramme de J et de J hydrolysé.

Polyamide Merck, $\text{MeOH-H}_2\text{O-AcOH}$ (90:5:5)

Rév.: UV 350 nm

○ : bleu-vert

◐ : brun

L'hydrolyse de J conduit à un spot de R_f inférieur correspondant à la décussatine. La recherche des sucres (voir partie expérimentale) a permis de mettre en évidence le glucose et le xylose.

L'aglycone a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec le solvant $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (95:5). Il est identique à D (décussatine) : mêmes comportements chromatographiques, mêmes points de fusion, mêmes spectres UV, spectres IR superposables.

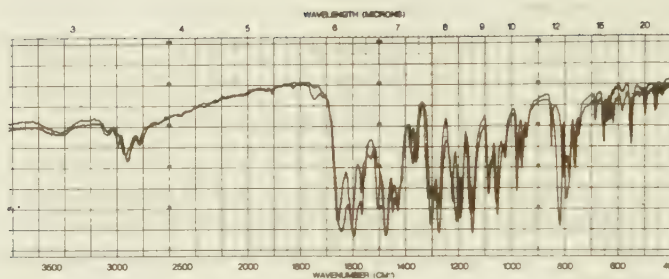


Fig. 59 : Spectres IR de J hydrolysé et de la décussatine dans KBr.

Ainsi, la substance J est un O-glycoside de la décussatine. Le sucre est probablement le primevéroside qui, par hydrolyse acide, donne du xylose et du glucose [6].

Le spectre RMN de J acétylé est représenté dans la figure 60.

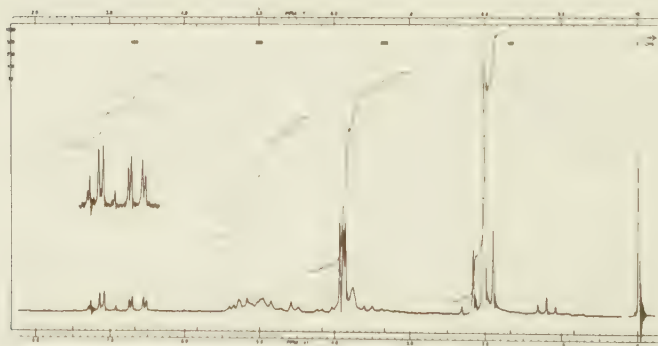


Fig. 60 : Spectre RMN de J acétylé dans CDCl_3 .

Dix-huit protons correspondant à 6 groupes acétoxyles aliphatiques apparaissent entre 1,90 et 2,20 ppm.

Dans la région 3,30-5,50 ppm, se trouvent 21 protons; parmi eux, 3 singulets représentant les 3 groupes méthoxyles aromatiques. Ainsi, le reste osidique est formé de 6 groupes hydroxyles et de 13 protons non hydroxyliques, ce qui correspond au disaccharide primevérose.

Les protons aromatiques H_2 et H_4 apparaissent à 6,58 et 6,72 ppm (spectre AB, $J = 2,5$ cps). Les protons H_5 et H_6 forment un spectre AB à 7,05 et 7,18 ppm ($J = 9,5$ cps).

Ainsi, la substance J est le primevéroside de la décussatine. Son spectre IR est indiqué dans la figure 61.

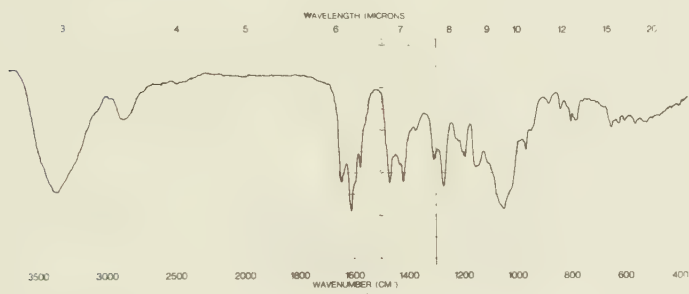
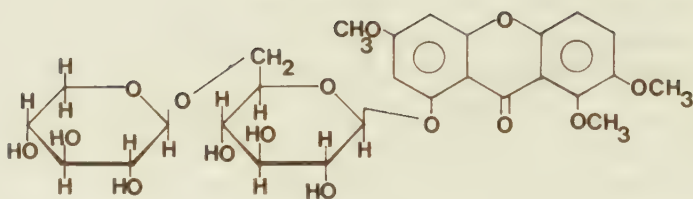


Fig. 61 : Spectre IR de J dans KBr.

Le primevéroside de la décussatine a été décelé dans les racines de Gentiana verna par RIVAILLE & COLL. [15]. Mais ces auteurs, n'ayant pas pu l'obtenir sous forme cristalline, n'en ont décrit aucun spectre.

Il est extrêmement intéressant de trouver ce glycoside nouveau dans Gentiana bavarica et dans Gentiana verna (racines), ces 2 espèces appartenant à la même section.



I = primevéroside de la décussatine

6.7. Identification de I

Nous avons obtenu 160 mg de substance I pure après recristallisation dans le méthanol à 90%.

Microcristaux jaune pâle, F. = 163°C.

L'étude des spectres UV permet de tirer les renseignements suivants :

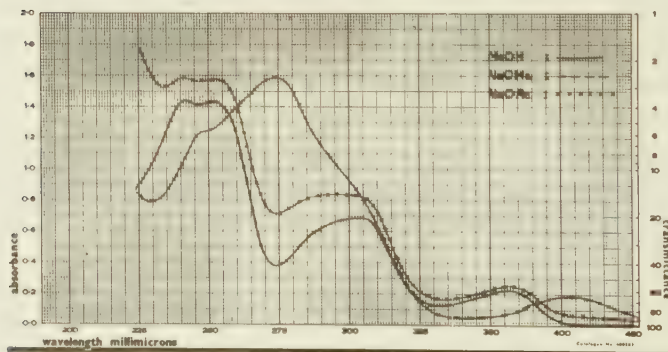


Fig. 62 : Spectres UV de I dans le méthanol.

Tableau 48 : Maxima d'absorption des spectres UV de I

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	362	304	253	242
+AlCl ₃	362	304	253	242
+NaOMe	408		275	246
+NaOAc	362	304	253	242

Le spectre UV de I est caractéristique d'une xanthone. Comme l'addition de AlCl₃ ne modifie pas l'allure du spectre, nous pouvons exclure la présence d'un groupe o-dihydroxyle ou celle d'un hydroxyle libre en position 1 ou 8.

En revanche, la présence d'un hydroxyle libre en position 7 est probable : pas de modification du spectre par l'addition de NaOAc, mais déplacement bathochrome important sous l'effet de NaOMe.

La valeur R_F élevée de la substance I indique qu'il s'agit probablement d'un glycoside. L'hydrolyse acide confirme cette hypothèse. Le comportement chromatographique de I et de I hydrolysé est indiqué dans la figure 62.

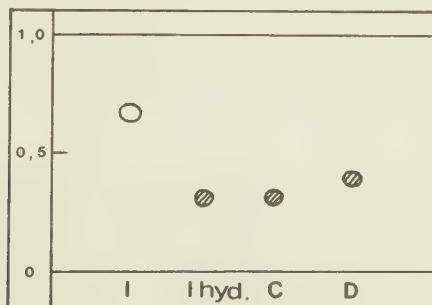


Fig. 63 : Chromatogramme de I et de I hydrolysé.
 Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)
 Rév.: UV 350 nm

L'hydrolyse de I conduit à un spot de R_f inférieur correspondant à la substance C (gentiacauléine).

La recherche des sucres (voir partie expérimentale) a mis en évidence du glucose et du xylose.

L'aglycone de I a été purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec le solvant CHCl_3 -MeOH (95:5). Il est identique à la substance C (gentiacauléine) : comportements chromatographiques, points de fusion, spectres UV, IR et NMR identiques.

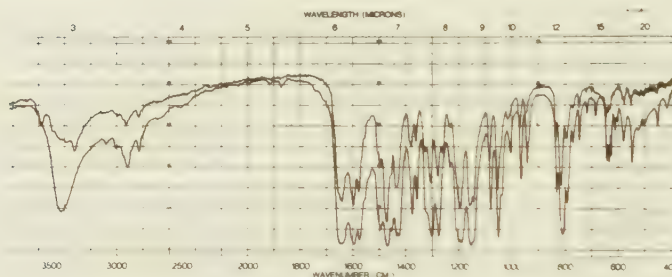
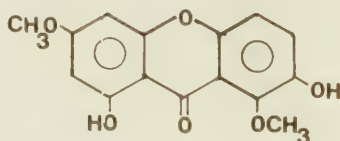


Fig. 64 : Spectres IR de I hydrolysé et de la gentiacauléine.

C = gentiacauléine



La substance I est un O-glycoside de la gentiacauléine.

La position d'attache du sucre ne peut être qu'en position 1 puisque le spectre UV de I montre l'absence d'un groupe OH libre dans cette position et la présence d'un groupe OH libre en position 7. Le sucre est certainement le disaccharide primevérose, car nous avons mis en évidence le glucose et le xylose dans l'hydrolysats de I.

Le spectre RMN du dérivé acétylé de I est représenté à la figure 65.

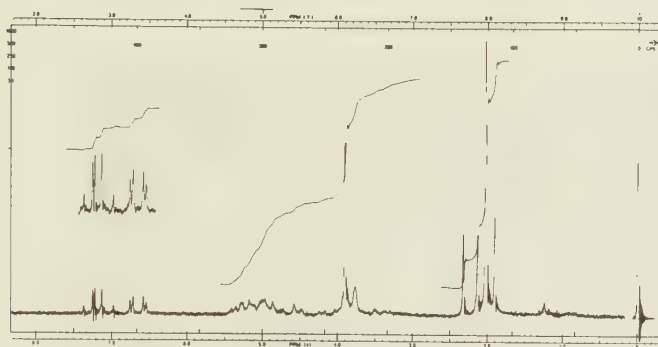


Fig. 65 : Spectre RMN de I acétylé dans CDCl_3 .

Entre 1,8 et 2,2 ppm se trouvent 3 singulets correspondant à 6 groupes acétoxyles aliphatiques. Le groupe acétoxy aromatique apparaît à 2,31 ppm. Le déplacement chimique assez bas de ce groupe indique qu'il ne se trouve pas au voisinage de la fonction carbonyle (position 1 ou 8) [21]. La courbe d'intégration indique la présence de 19-20 protons entre 3,30 et 5,50 ppm. Parmi eux se trouve, à 3,90 ppm, un singulet correspondant à 2 méthoxyles. Les protons H_2 et H_4 forment un spectre AB à 6,60 et 6,70 ppm ($J = 2,5$ cps). A 7,08 et 7,28 ppm se trouvent les protons H_5 et H_6 (spectre AB, $J = 10$ cps).

Le spectre RMN de I acétylé confirme la structure d'un O-primevéroside de la gentiacauléine, la position d'attache du sucre ne pouvant être qu'en 1.

Une preuve supplémentaire peut être apportée par la méthylation de la substance I. En effet, si la structure établie est exacte, la méthylation de I ne peut conduire qu'à la substance J (primevéroside de la décussatine).

La substance I, en solution dans le méthanol, a été méthylée selon les indications de ROSPRIM [28]. Le produit obtenu a été purifié par recristallisation dans le méthanol. Son spectre UV est représenté dans la figure 66.

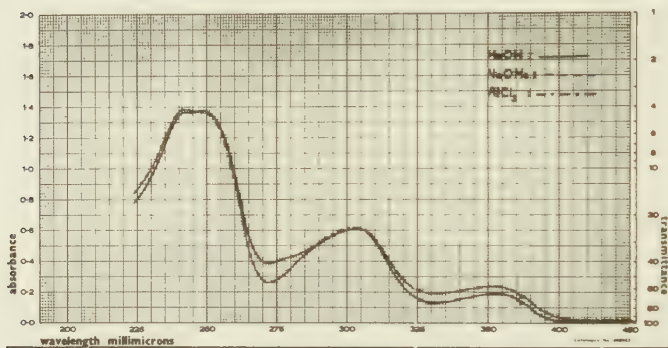


Fig. 66 : Spectres UV de I méthylé.

Tableau 49 : Maxima d'absorption des spectres UV de I méthylé

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	354	304	250	242
+AlCl ₃	354	304	250	242
+NaOMe	354	304	250	242

Les spectres UV montrent que la méthylation est complète : aucune modification de l'allure du spectre par l'addition des réactifs AlCl₃ et NaOMe. Par ailleurs, ils sont identiques aux spectres UV de la substance J (voir fig. 56).

Les spectres IR de I méthylé et de J sont superposables (voir fig. 67).

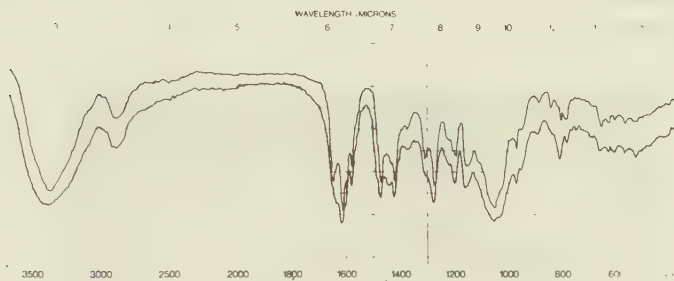
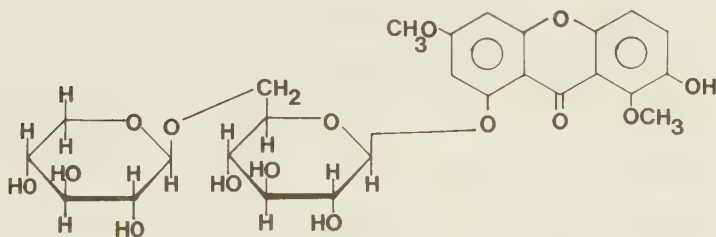


Fig. 67 : Spectre IR de I méthylé et de J dans KBr.

L'hydrolyse acide de I méthylé conduit à la décussatine : identité des spectres UV et IR, mêmes points de fusion. Ainsi, la position d'attache du sucre ne peut être qu'en 1. La substance I est par conséquent l'hydroxy-7 diméthoxy-3,8-O-primevérosyl-1 xanthone ou primevérosyl-1 gentiacauléine.



I = O-primevérosyl-1 gentiacauléine

La substance isolée est nouvelle. Nous proposons de lui attribuer le nom de gentiabavaroside.

Rappelons cependant ici qu'un primevéroside de la gentiacauléine, le gentiacauloside, a déjà été isolé à partir des feuilles et des racines de Gentiana acaulis et de Gentiana Kochiana; mais, dans ce glycoside, le primevérose est fixé en position 7 [9][12].

6.8. Identification de H

Selon le schéma de la figure 41, nous avons isolé 85 mg de substance H pure. F.: 219-221°C (recristallisation dans le méthanol).

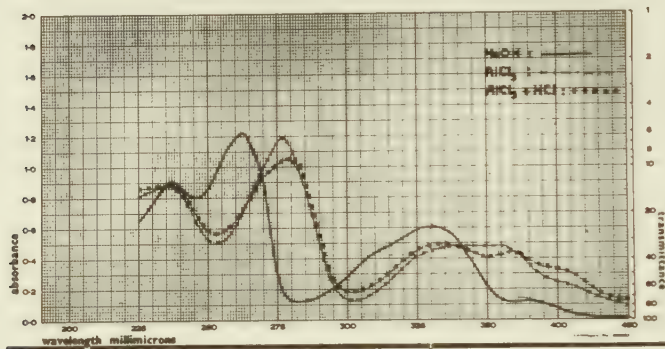


Fig. 68 : Spectres UV de H.

Tableau 50 : Maxima d'absorption des spectres UV de H

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	378	330	263	237
+AlCl ₃	~ 408	360	339	278
+AlCl ₃ /HCl		355	334	273

Le spectre UV de H est typique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle libre en position 1 ou 8. De plus, elle est probablement tétrasubstituée en 1,3,7,8 [41].

La valeur R_f élevée indique qu'il s'agit probablement d'un glycoside. L'hydrolyse acide conduit à un spot de R_f inférieur, ainsi qu'au glucose et au rhamnose (voir partie expérimentale : recherche des sucres). Le comportement

chromatographique de H avant et après hydrolyse est représenté dans la figure 69.

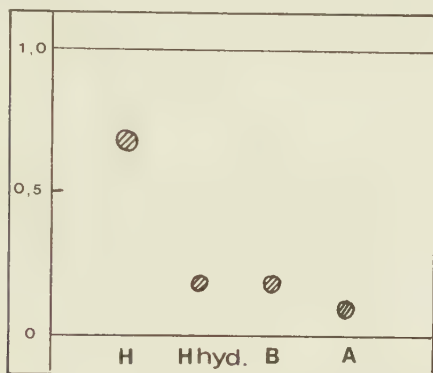


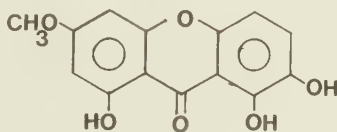
Fig. 69 : Comportement chromatographique de H avant et après hydrolyse acide.

Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)

Rév.: UV 350 nm.

La valeur R_f de la substance H hydrolysée correspond à celle de B. L'aglycone recristallisé dans le méthanol fond à 224°C. Les spectres UV et IR sont identiques à ceux de la substance B (gentiakochianine).

gentiakochianine :



Ainsi, la substance H est un O-glycoside de la gentiakochianine, le sucre étant formé de glucose et de rhamnose.

Le spectre RMN du dérivé acétylé de H est représenté dans la figure 70.

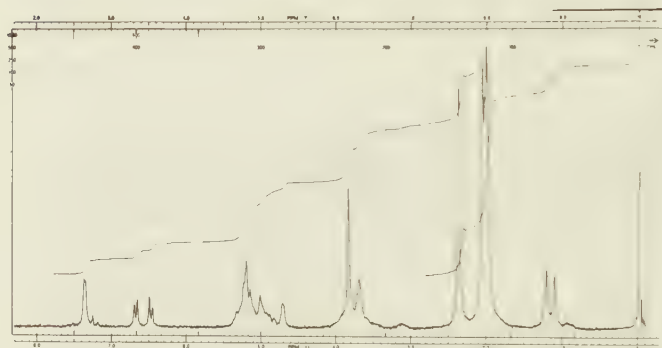


Fig. 70 : Spectre RMN de H acétylé.

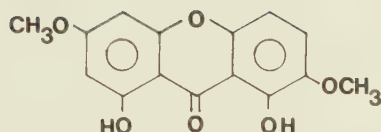
Un doublet centré à 1,17 ppm ($J = 6$ cps) indique la présence du groupe méthyle du rhamnose [47]. Entre 1,80 et 2,2 ppm apparaissent 18 protons, correspondant à 6 groupes acétoxyles aliphatiques.

Deux acétoxyles aromatiques se trouvent à 2,43 ppm (position 1 et 8) [21]. Entre 3,30 et 5,50 ppm apparaissent 15 protons et parmi eux, à 3,86 ppm, un singulet pouvant être attribué au groupe méthoxyle. Les protons H_2 et H_4 forment un spectre AB à 6,50 et 6,67 ppm ($J = 2,4$ cps). Les protons H_5 et H_6 apparaissent à 7,36 et 7,41 ppm (spectre AB, $J = 10$ cps).

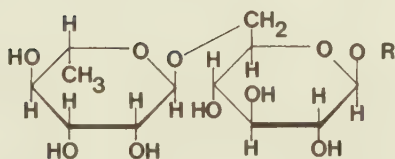
L'étude du spectre RMN de H acétylé, montre que le sucre ne peut être qu'un rhamnoglucoside, puisque les positions 1 et 8 sont occupées par des groupes hydroxyles. La position d'attache du sucre est, par conséquent, en 7. La comparaison avec le spectre RMN de la décussatine acétylée montre d'ailleurs que les protons H_2 et H_4 ne sont pas déplacés (voir tableau 43).

D'autre part, le spectre UV de H est identique à celui de la swertiapérénnine : $\lambda_{\max}$ à 380, 330, 263, 238 nm [12].

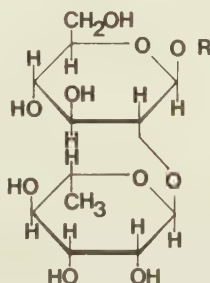
swertiapérennine :



Les seuls disaccharides, contenant du glucose et du rhamnose, trouvés dans les hétérosides polyphénoliques naturels sont le rutinose et le néohespéridose, respectivement 6- et 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranose [48].



rutinose



néohespéridose

MABRY & ROESLER [47], en étudiant les spectres RMN d'une série de rhamnoglucosides flavoniques acétylés, ont établi des règles permettant de distinguer les rutinoides des néohespéridosides. Dans les néohespéridosides acétylés, le multiplet complexe entre 4,50 et 5,50 ppm, indique la présence de 7 protons correspondant aux positions 1,2,3,4 du rhamnose et 1,3,4 du glucose. Les signaux à 3,40 - 4,40 ppm représentent 5 protons : position 5 du rhamnose et positions 2,5,6 du glucose. Dans les rutinoides acétylés, les signaux entre 4,50 et 5,50 ppm

représentent 8 protons (positions 1,2,3,4 du glucose et 1,2,3,4 du rhamnose), tandis que les signaux à 3,40 - 4,40 ppm correspondent à 4 protons (positions 5 et 6 du glucose et 6 du rhamnose).

Dans le cas de H acétylé, la courbe d'intégration pour la région 4,50 - 5,50 ppm indique la présence de 8 protons, tandis qu'entre 3,40 et 4,40 ppm se trouvent 7 protons, dont 3 correspondent au groupe méthoxyle. Par conséquent, la substance H est un rutinoside.

Cependant, le spectre IR de H montre la présence d'une bande vers 1720 cm^{-1} qui ne peut être attribuée qu'à un ester ou à une lactone. La figure 71 représente les spectres IR de H et de H hydrolysé.

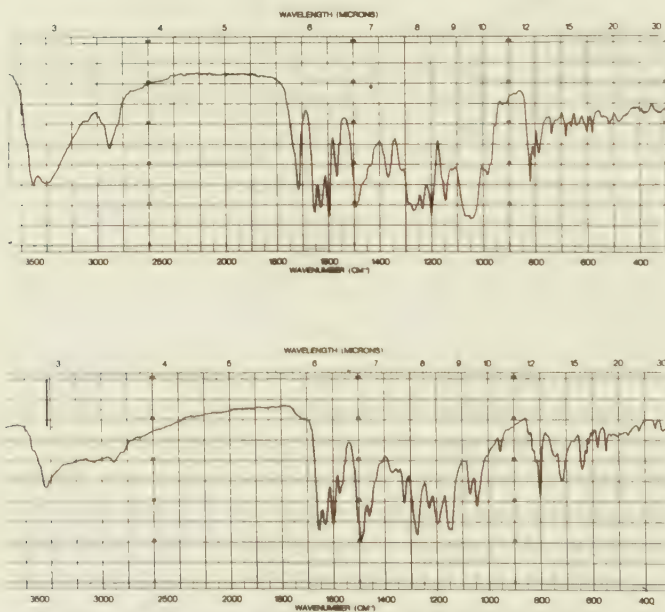


Fig. 71 : Spectres IR de H et de H hydrolysé dans KBr.

La bande vers 1720 cm^{-1} a disparu dans le spectre de l'aglycone. Afin d'obtenir davantage de renseignements sur la présence inattendue de cette bande, nous avons enregistré le spectre RMN de H dans DMSO.

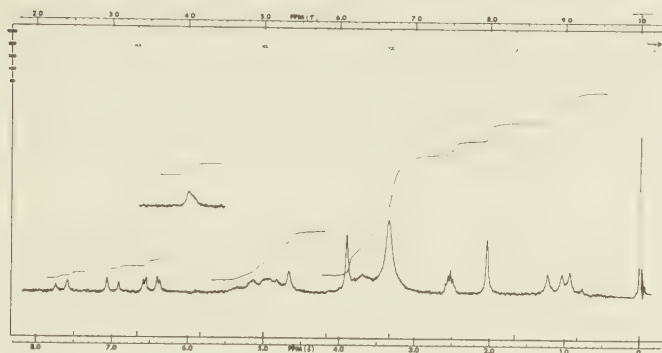
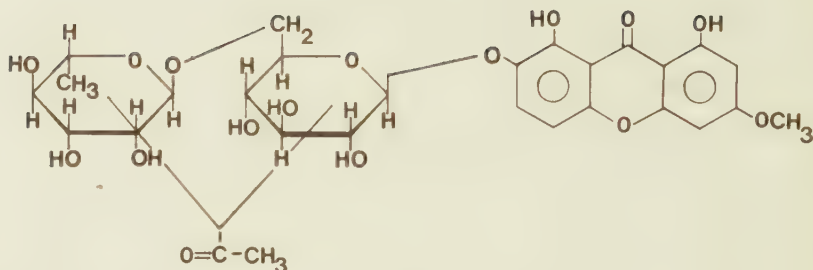


Fig. 72 : Spectre RMN de H dans DMSO.

Vers 1 ppm apparaît un doublet correspondant au groupe méthyle du rhamnose. Le singulet à 2,05 ppm (3 protons) ne peut être attribué qu'à un groupe acétoxyle aliphatique. Entre 3,00 et 5,50 ppm (multiplet complexe) se trouve un singlet ($\delta = 3,90\text{ ppm}$) correspondant à un groupe méthoxy-le. Les 4 protons aromatiques forment des spectres AB à 6,40 et 6,55 ppm ($J = 2,3\text{ cps}$) et à 7,04 et 7,62 ppm ($J = 9,5\text{ cps}$). Enfin, les 2 protons hydroxyles, fortement déblindés par la proximité immédiate de la fonction carbonyle, apparaissent à 11,85 ppm.

Par conséquent, la présence d'une bande vers 1720 cm^{-1} dans le spectre IR de H peut être attribuée à un groupe acétoxyle aliphatique. La position d'attache de ce groupe ne peut se trouver que sur le rutinose.

Ainsi, la substance H est un O-acétyl-rutinoside en 7 de la gentiakochianine auquel nous proposons d'attribuer le nom de gentiabavarutinoside.



En 1972, WAGNER & COLL. [49] ont isolé à partir de Linum maritimum pour la première fois un O-acétyl-rhamnoglucoside flavonique. Ils n'ont cependant pas établi la position d'attache du groupe acétyle sur la partie glycosidique.

Signalons enfin que la substance H est le premier rhamnoglucoside xanthonique décrit, presque tous les glycosides xanthoniques connus étant des primevérosides.

6.9. Identification de G

La substance G a été purifiée par recristallisation dans le méthanol. Cristaux jaunes, F. = 221°C. Quantité isolée : 32 mg.

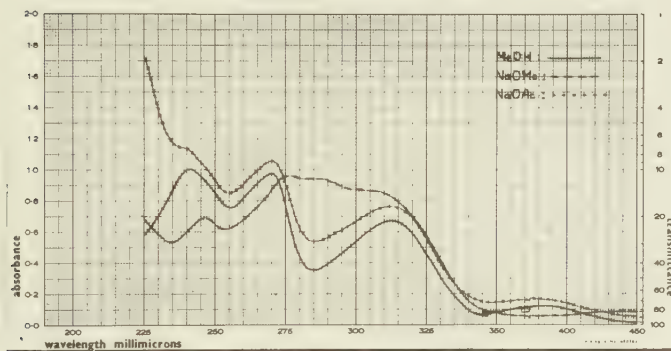
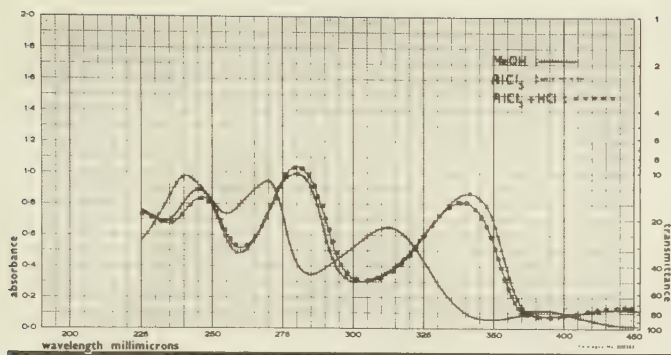


Fig. 73 : Spectres UV de G dans le méthanol.

Tableau 51 : Maxima d'absorption des spectres UV de G

Solvant	Maxima [nm]				
MeOH	380	312	270	240	
+AlCl ₃	~440	341	280	248	
+AlCl ₃ /HCl	~440	338	280	245	
+NaOMe	~435	~307	~287	275	246
+NaOAc	380	312	280	~240	

Le spectre UV de G est caractéristique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle libre en position 1 ou 8. Comme l'addition de NaOAc ne modifie pas l'allure du spectre, la position 3 doit être substituée.

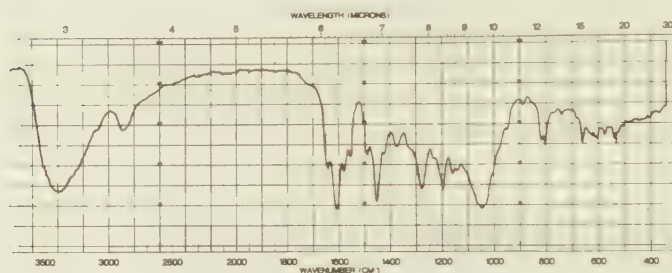


Fig.74 : Spectre IR de G

L'hydrolyse acide conduit à un spot de R_f inférieur, au glucose et au xylose. Le comportement chromatographique de G et de G hydrolysé est indiqué dans la figure 75.

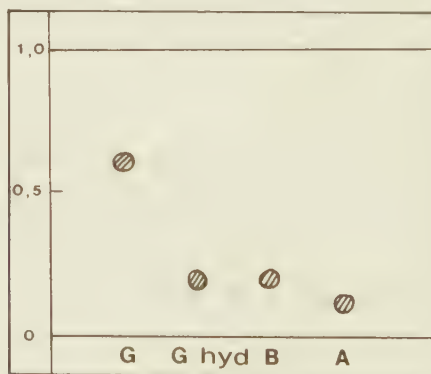


Fig.75 : Chromatogramme de G et de G hydrolysé.
Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)
Rév.: UV 350 nm.

L'hydrolyse de G conduit à un spot correspondant à la gentiakochianine. Après purification par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20, l'aglycone de G s'avère identique à la gentiakochianine : mêmes spectres UV et IR.

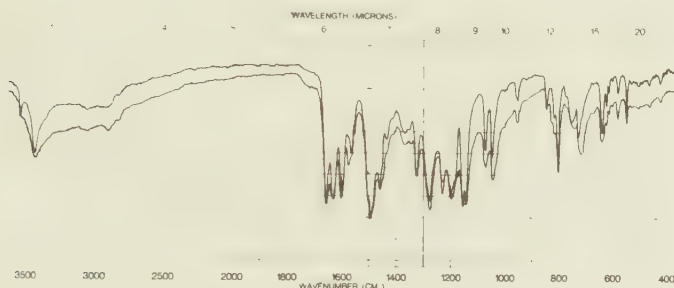


Fig. 76 : Spectres IR de G hydrolysé et de la gentiakochianine dans KBr.

La substance G est donc un primevéroside de la gentiakochianine.

Gentiakochianine :

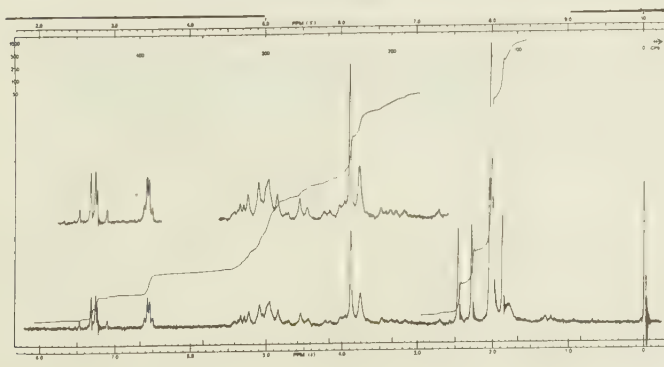
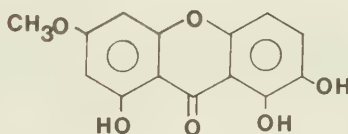


Fig. 77 : Spectre RMN de G acétylé dans CDCl_3 .

Le spectre RMN de G acétylé est représenté dans la figure 77.

Entre 1,85 et 2,10 ppm se trouvent 18 protons correspondant aux 6 groupes acétoxyles du primevérose. Le spectre montre également la présence de 2 acétoxyles phénoliques dont un seul au voisinage de la fonction carbonyle (à 2,48 ppm); l'autre, à 2,30 ppm, est en position 7. Ainsi, le sucre peut se trouver en 1 ou en 8. Entre 3,30 et 5,50 ppm apparaissent environ 17 protons; parmi eux, un singulet à 3,89 ppm correspondant à un groupe méthoxyle. Les 4 protons aromatiques se trouvent à 6,53 et 6,63 ppm (spectre AB, $J = 2,5$ cps) et à 7,23 et 7,35 ppm (spectre AB, $J = 10$ cps).

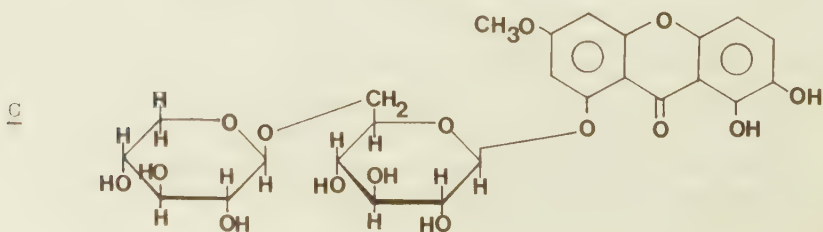
L'étude du spectre ci-dessus montre que la position d'attache du sucre ne peut être qu'en 1 ou en 8. Nous lui attribuons la position 1, car le spectre UV de G est différent de celui du gentiakochianoside (primevéroside en 8 de la gentiakochianine) [12].

Substance G : $\lambda_{\max}$ 380 312 270 240

Gentiakochianoside : $\lambda_{\max}$ 364 306 256 238

Lorsque nous aurons isolé davantage de substance G, nous pourrons apporter une vérification supplémentaire. En effet, la méthylation des hydroxyles phénoliques, suivie de l'hydrolyse, doit conduire à la décussatine.

La substance G est ainsi un primevéroside xanthonique nouveau, isomère du gentiakochianoside identifié par RIVAILLE & COLL. [13][12] dans les racines de Gentiana Kochiana, auquel nous attribuons le nom d'isogentiakochianoside.



6.10. Identification de F

La substance F a été purifiée par recristallisation dans le méthanol. Cristaux jaunes, F.: 247°C (décomp.). Quantité isolée : 44 mg.

L'étude des spectres UV permet de tirer les renseignements suivants :

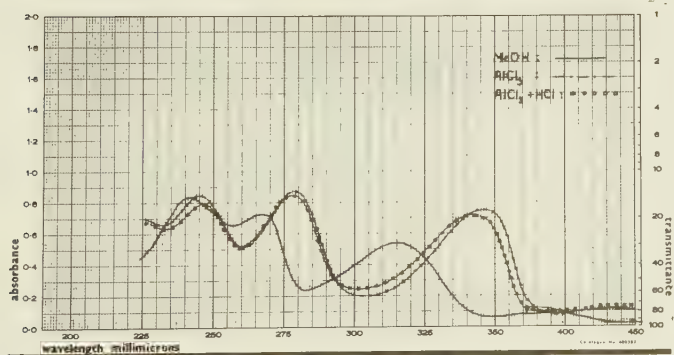
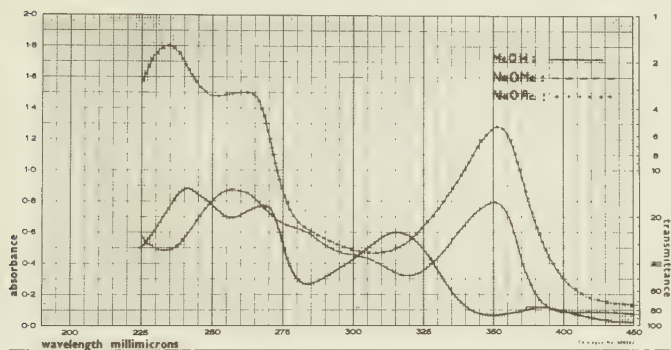


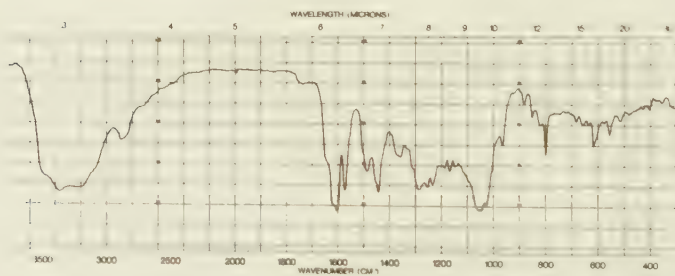
Fig. 78 : Spectres UV de F dans le méthanol.

Tableau 52 : Maxima d'absorption des spectres UV de F

Solvant	Maxima [nm]				
MeOH	378	315	267	242	
+AlCl ₃	435	347	278	247	
+AlCl ₃ /HCl	435	343	278	24 ^e	
+NaOAc		351	262		
+NaOMe		351	305	283	257

Le spectre UV de F est caractéristique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle en 1 ou en 8.

L'addition de NaOMe, ainsi que celle de NaOAc, provoquent à peu près la même modification de l'allure du spectre, d'où présence probable d'un groupe hydroxyle en position 3.

Fig. 79 : Spectre IR de F.

L'hydrolyse acide de F conduit à un spot de R_f inférieur, au glucose et au xylose.

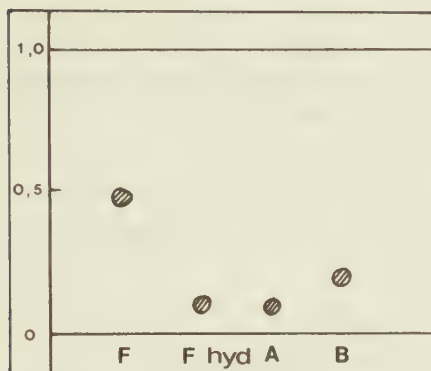


Fig. 80 : Comportement chromatographique de F et F hydrolysé.
Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)
Rév.: UV 350 nm.

L'aglycone de F est identique à la substance A (tétra-hydroxy-1,3,7,8 xanthone) : mêmes spectres UV et IR.

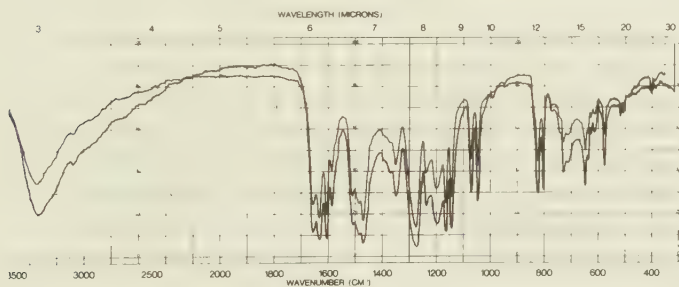


Fig. 81 : Spectres IR de F hydrolysé et de A dans KBr.

Ainsi, la substance F est un primevéroside de la tétra-hydroxy-1,3,7,8 xanthone.

L'étude du spectre RMN de F acétylé permet de tirer les renseignements suivants :

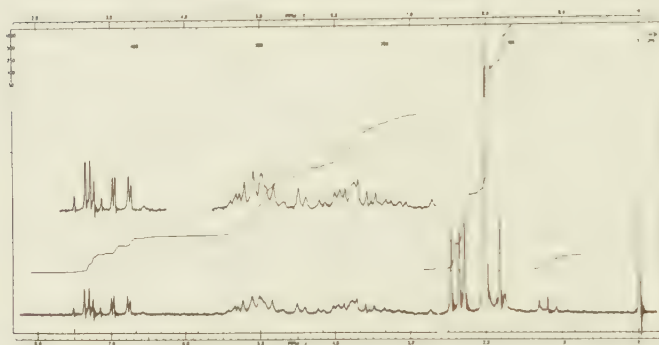


Fig. 82 : Spectre RMN de F acétylé dans CDCl_3 .

Entre 1,80 et 2,10 ppm se trouvent 18 protons correspondant à 6 groupes acétoxyles aliphatiques. Les 3 acétoxyles phénoliques forment des singulets à 2,30; 2,37; 2,49 ppm, ce dernier indiquant le voisinage immédiat de la fonction carbonyle [21].

Le multiplet complexe entre 3,00 et 5,50 ppm montre la présence de 13 protons de sucre. Enfin, les 4 protons aromatiques forment des spectres AB à 6,75 et 6,96 ppm ($J = 2,3$ cps) et à 7,28 et 7,40 ppm ($J = 10$ cps). En comparant le spectre RMN de F acétylé avec celui de la tétra-acétoxy-1,3,7,8 xanthone, on constate que seuls les protons H_2 et H_4 sont déplacés.

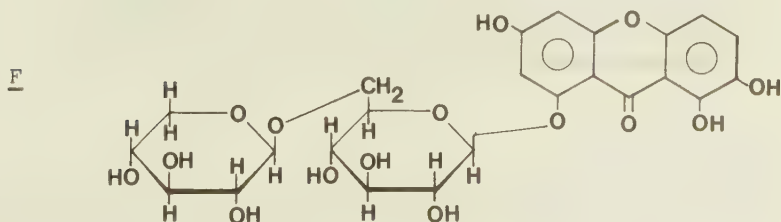
Tableau 53 : Spectres RMN de F acétylé et de la tétra-acétoxy-1,3,7,8 xanthone dans CDCl_3 (δ en ppm par rapport au T.M.S. pris comme référence interne)

	H_2 et H_4	H_5 et H_6
<u>F</u> acétylé	6,75 6,96	7,28 7,40
tétra-acétoxy- 1,3,7,8 xanthone	6,80 7,20	7,33 7,45

Comme F acétylé ne possède qu'un seul groupe acétoxye en α de la fonction carbonyle, le sucre ne peut être attaché au squelette xanthonique qu'en position 1. La substance F est par conséquent la trihydroxy-3,7,8 O-primevérosyl-1-xanthone.

F est ainsi un nouveau primevéroside xanthonique auquel nous attribuons le nom de norswertiaprimevéroside, son aglycone étant connu sous le nom de norswertianine [45].

La méthylation de F, suivie de l'hydrolyse, pourra être entreprise dans le but de vérifier la structure proposée.



6.11. Identification de E

La substance E n'a été isolée qu'en très faible quantité : ~ 1 mg. L'étude des spectres UV nous permet cependant de tirer les renseignements suivants :

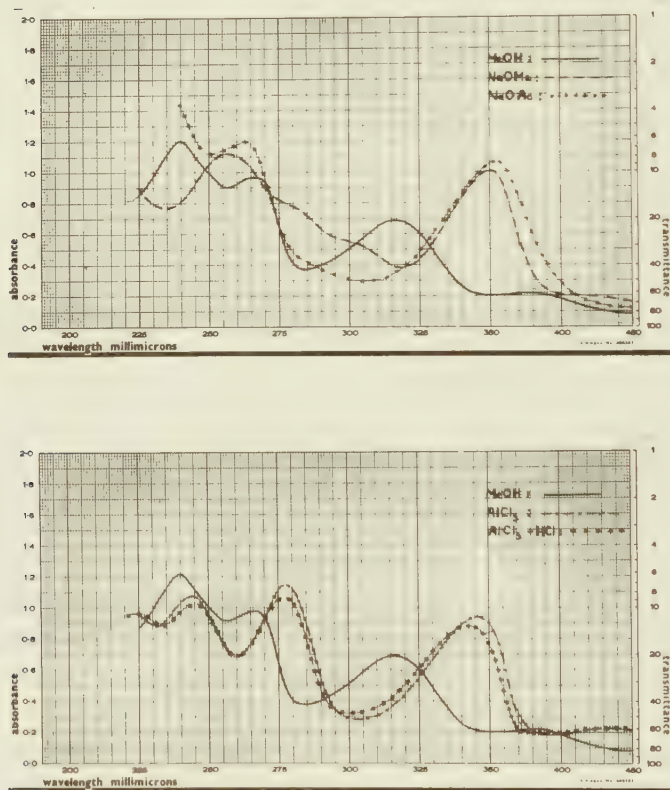


Fig. 83 : Spectres UV de E dans MeOH.

Tableau 54 : Maxima d'absorption des spectres UV de E

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	378	315	267	242
+AlCl ₃	435	347	278	247
+AlCl ₃ /HCl	435	343	278	245
+NaOAc		352	262	
+NaOMe		351	305	257

Ce spectre est caractéristique d'une xanthone possédant un groupe hydroxyle libre en 1 ou 8 et en 3. On remarque de plus qu'il est semblable au spectre UV de F (voir fig. 78 et tableau 52).

L'hydrolyse acide conduit à un spot de R_F inférieur et au glucose.

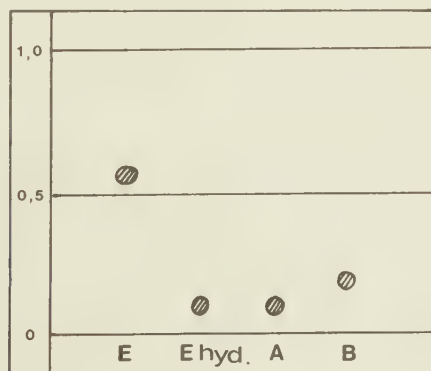


Fig. 84 : Chromatogramme de E et E hydrolysé
Polyamide Merck, MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)
Rév.: UV 350 nm.

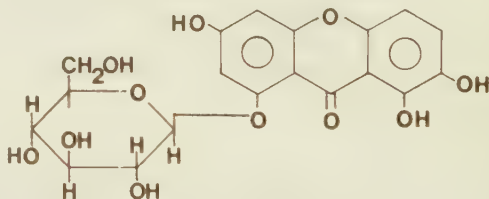
La substance E hydrolysée correspond à la tétra-hydroxy-1,3,7,8 xanthone. D'autre part, la similitude des spectres UV de F et de E indique que la position d'attache des sucres est la même dans les 2 substances : position 1.

La valeur R_f différente de F et E est certainement due à la présence de sucres différents dans ces 2 substances, à savoir le glucose dans le cas de E et le primevérose dans le cas de F.

La substance E pourrait par conséquent être la trihydroxy-3,7,8 O-glucosyl-1 xanthone. Il est bien entendu que seule l'étude des spectres RMN de E permettra de vérifier cette hypothèse.

Par analogie avec la substance F, nous lui attribuons le nom de norswertiaoglucoside.

Structure probable de E :



6.12. Relations entre les substances isolées

Toutes les substances isolées à partir des différents extraits de feuilles de *Gentiana bavarica* sont des xanthonés substituées en 1,3,7,8. Les substituants sont des groupes hydroxyles, des groupes méthoxyles et des restes O-glycosidiques. Une vérification a été apportée par l'hydrolyse acide de l'extrait méthanolique formé des O-glycosides xanthoniques, suivie de la méthylation par un excès de diazométhane (voir partie expérimentale). La figure 85 illustre le comportement chromatographique de l'extrait méthanolique, de l'extrait méthanolique après hydrolyse acide et de l'extrait méthanolique hydrolysé puis méthylé.

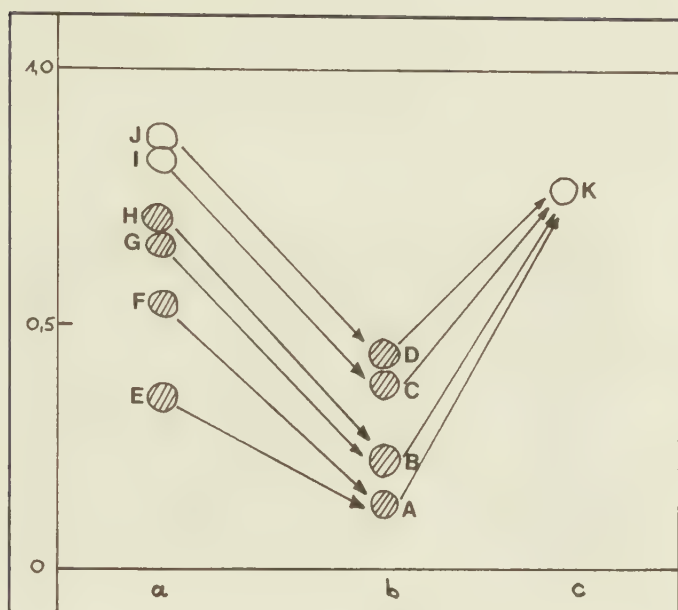


Fig. 85 : Chromatogramme montrant les relations entre les xanthones isolées des feuilles de Gentiana bavarica. Polyamide Merck, MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5), Rév.: UV 350 nm

○ : bleu-vert

● : brun

↘ : hydrolyse acide

↗ : méthylation

a) extrait méthanolique

b) extrait méthanolique hydrolysé

c) extrait méthanolique hydrolysé méthylé.

Ainsi, l'hydrolyse acide de l'extrait méthanolique conduit aux substances A, B, C et D, qui ont également été identifiées dans les extraits ligroïniques et étherés.

La méthylation complète du mélange de A, B, C et D conduit à un seul spot K, de R_f plus élevé et de coloration bleue sous lumière UV à 350 nm. La substance K ne peut être que la tétraméthoxy-1,3,7,8 xanthone; la figure 86 montre son spectre UV.

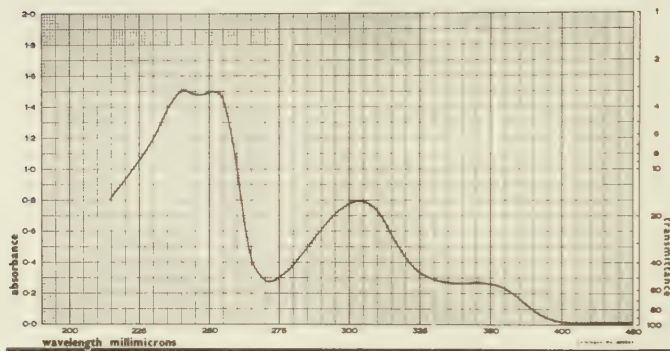


Fig. 86 : Spectre UV de K dans MeOH.

Tableau 55 : Maxima d'absorption des spectres UV de K

Solvant	Maxima [nm]			
MeOH	350	303	251	242
+AlCl ₃	350	303	251	242
+NaOMe	350	303	251	242

Le spectre UV de K est typique d'une xanthone ne possédant aucun groupe hydroxyle libre (aucune modification de l'allure du spectre par addition de AlCl₃ et NaOMe). Il est identique à celui de la tétraméthoxy-1,3,7,8 xanthone

($\lambda_{\max}$ à 351, 303, 252, 242) [42]. Les points de fusion de K et de la tétraméthoxy-1,3,7,8 xanthone sont identiques (165-167°C). Le spectre IR de la substance K est représenté dans la figure 87.

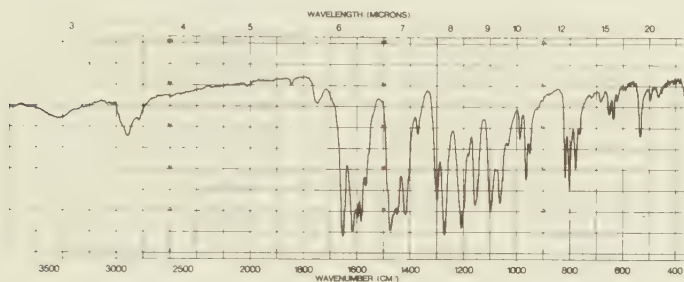
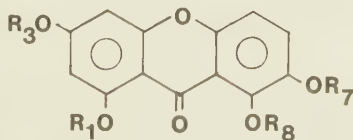
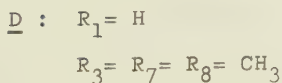
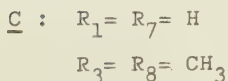
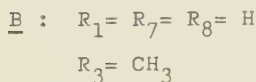
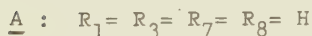


Fig. 87 : Spectre IR de K dans KBr.

6.13. Résumé et conclusion

A partir des extraits ligroïniques, étherés et méthanoliques des feuilles de Gentiana bavarica, nous avons isolé, par chromatographie préparative sur colonne de polyamide, les 10 xanthones suivantes :



E : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_3 = R_7 = R_8 = \text{H}$ (structure probable)

F : $R_1 = \text{primevérosyle}$, $R_3 = R_7 = R_8 = \text{H}$

G : $R_1 = \text{primevérosyle}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_7 = R_8 = \text{H}$

H : $R_1 = R_8 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_7 = \text{O-acétylrutinosyle}$

I : $R_1 = \text{primevérosyle}$, $R_3 = R_8 = \text{CH}_3$, $R_7 = \text{H}$

J : $R_1 = \text{primevérosyle}$, $R_3 = R_7 = R_8 = \text{CH}_3$

La structure a été établie sur la base de l'étude des spectres UV, du comportement à l'hydrolyse acide et des spectres RMN des dérivés acétylés des aglycones et des glycosides. Toutes les substances isolées sont substituées en 1,3,7,8. Une vérification a été apportée par la méthylation des aglycones qui conduit à un seul composé, la tétraméthoxy-1,3,7,8-xanthone.

Les substances E, F, G, H, I sont des glycosides xanthoniques nouveaux, auxquels nous attribuons respectivement les noms de norswertiaoglucoside, norswertiaprimevéroside, isogentiakochianoside, gentiabavarutinoside et gentiabavaroside. La substance H est particulièrement intéressante : elle est le premier rhamnoglucoside xanthonique décrit. De plus, elle se distingue par la présence d'un groupe acétoxyle sur la partie glycosidique. La position d'attache de ce groupe n'a cependant pas été déterminée.

Relevons le fait que les xanthones substituées en 1,3,7,8 n'ont pratiquement été isolées que dans la famille des Gentianacées : Macrocarpaea [42], Canscora [44], Swertia [12][43][45] et Gentiana (acaulis, verna et Kochiana) [12].

Bien entendu, il conviendrait d'examiner encore l'extrait à l'acétate d'éthyle. En effet, il est possible que l'on puisse déceler d'autres substances à côté de celles déjà identifiées.

7. RESUME ET CONCLUSION

7.1. Composés isolés à partir de *Gentiana lutea*

En modifiant la méthode d'extraction, nous avons isolé, à partir des feuilles de *Gentiana lutea*, la dihydroxy-1,3-méthoxy-7 xanthone (isogentisine) qui n'avait pas été signalée par BELLMANN [19] lors de son étude sur les composés flavoniques et xanthoniques de cette espèce. Cet auteur avait par ailleurs isolé 2 nouveaux O-glucosides de C-glucosides flavoniques sans en établir la structure.

Pour l'un de ces composés, nous avons établi qu'il s'agit du glucoside en 4' de l'isoorientine. Pour l'autre, nous avons montré qu'il s'agit d'un glucoside en 4' de l'isovitexine. Cependant, nous ne nous prononçons pas quant au nombre de glucoses fixés sur l'isovitexine.

Rappelons cependant que, selon BELLMANN [19], ils seraient au nombre de 3.

7.2. Phytochimie comparée de la section *Coelanth*

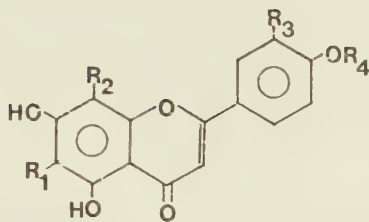
Nous avons recherché les composés flavoniques et xanthoniques, ainsi que le bornésitol, dans toutes les espèces de la section *Coelanth*. L'isolement a été entrepris à partir des extraits méthanoliques des différentes espèces par chromatographie préparative sur colonne de polyamide. Les critères de comparaison employés ont été les suivants : comportement chromatographique, comportement à l'hydrolyse acide, spectres UV et IR, point de fusion. La répartition des substances isolées dans les différentes espèces est

représentée dans le tableau 56.

Tableau 56 : Substances présentes dans les différentes espèces de la section Coelanthæ

	<u>G. lutea</u>	<u>G. purpurea</u>	<u>G. punctata</u>	<u>G. pannonica</u>	<u>G. villarsii</u>	<u>G. burseri</u>
bornésitol	+	+	+	+	+	+
<u>F</u>	+	+	+	+	+	+
<u>E</u>	+	+	+	+	+	+
<u>D</u>	+					
<u>D'</u>			+	+		(+)
<u>C</u>	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)
<u>B</u>	+	+	+	+	+	+
<u>A</u>	+					
<u>A₁</u>	+					
<u>G</u>			+	(+)		(+)
<u>E*</u>						+

(+) = présence probable

Flavones

F : $R_1 = R_4 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

E : $R_1 = R_4 = \text{glucosyle}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

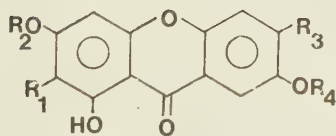
D' : $R_1 = R_2 = \text{glycosyle}$, R_3 : inconnu, $R_4 = \text{H}$

C : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$

B : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

G : R_1, R_2, R_3 : inconnus, $R_4 = \text{H}$

E* : glycoside flavonique inconnu

Xanthones

A : $R_1 = \text{glucosyle}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

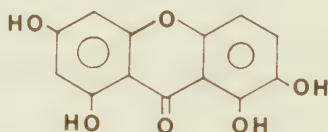
A₁ : $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4 = \text{CH}_3$

D : $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{primevérosyle}$, $R_4 = \text{CH}_3$

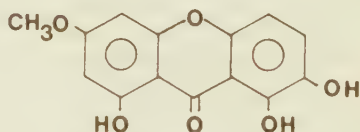
7.3. Composés isolés à partir de *Gentiana bavarica*

A partir des extraits ligroïnique, étheré et méthanolique des feuilles de *Gentiana bavarica*, nous avons isolé les 10 composés ci-après dont nous avons établi la structure.

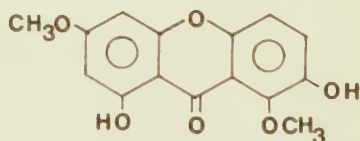
A: tétrahydroxy-1,3,7,8-xanthone
(norswertianine)



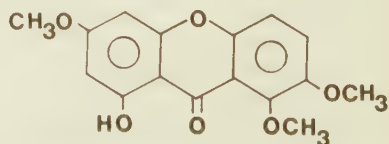
B: trihydroxy-1,7,8 méthoxy-3-xanthone
(gentiakochianine)



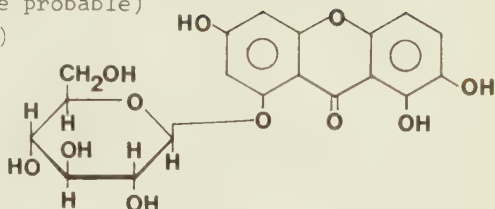
C: dihydroxy-1,7 diméthoxy-3,8-xanthone
(gentiacauléine)



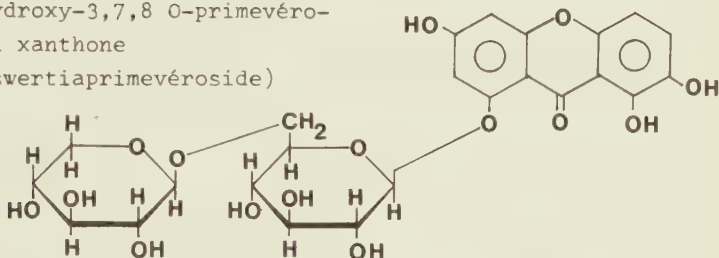
D: hydroxy-1 triméthoxy-3,7,8-xanthone
(décussatine)



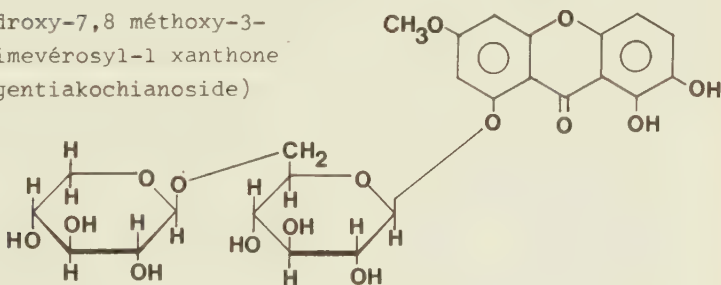
E: trihydroxy-3,7,8 O-glucosyl-1-xanthone (structure probable)
(norswertiaoglucoside)



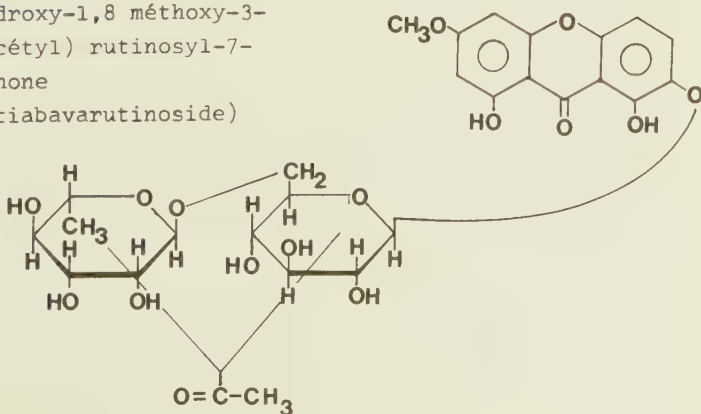
F: trihydroxy-3,7,8 O-primevérosyl-1 xanthone
(norswertiaprimevéroside)



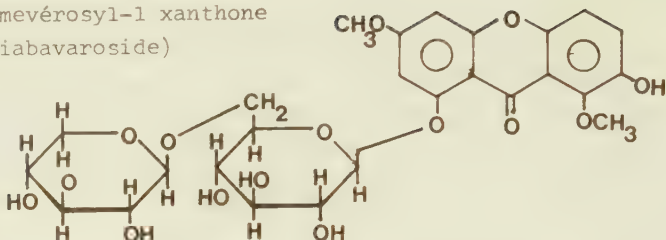
G: dihydroxy-7,8 méthoxy-3-O-primevérosyl-1 xanthone
(isogentiakochianoside)



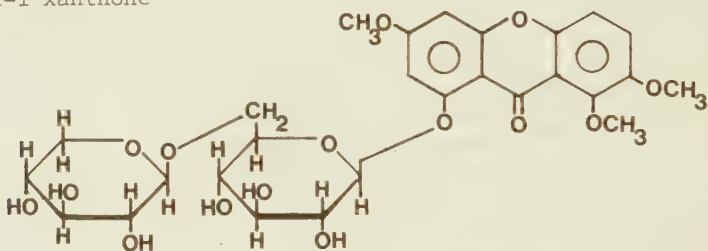
H: dihydroxy-1,8 méthoxy-3-(O-acétyl) rutinosyl-7-xanthone
(gentiabavarutinoside)



I: hydroxy-7 diméthoxy-3,8-
O-primevérosyl-1 xanthone
(gentiabavaroside)



J: triméthoxy-3,7,8-O-primevé-
rosyl-1 xanthone



Toutes les xanthones isolées sont substituées en 1,3,7,8.

Les substances E, F, G, H, I, sont des O-glycosides xantho-
niques nouveaux.

7.4. Conclusion

Il est intéressant de remarquer l'absence de xanthones dans toutes les espèces de la section Coelanthé, à l'exception de Gentiana lutea, dans les feuilles de laquelle 3 xanthones ont été identifiées. Cependant, les C-glucosides et O-glucosides de C-glucosides flavoniques, ainsi que le bornésitol mis en évidence dans Gentiana lutea L, sont répandus dans toutes les espèces de la section. Gentiana punctata, Gentiana pannonica

et Gentiana burseri se distinguent par la présence de 2 composés flavoniques qui n'ont pas été décelés dans les autres espèces. Malgré quelques différences entre certaines espèces de la section, notre travail a montré que la section Coelanthé se distingue par une distribution générale de C-glucosides et O-glucosides de C-glucosides flavoniques et, à l'exception de Gentiana lutea, par l'absence de xanthones. Cette absence est assez inattendue, car les xanthones sont considérées comme caractéristiques du genre Gentiana. Rappelons cependant à ce propos que les nombreuses xanthones identifiées dans le genre Gentiana ont été isolées à partir des racines et non des feuilles. Il serait extrêmement intéressant d'entreprendre l'isolement des composés phénoliques à partir des racines des espèces de la section Coelanthé autres que Gentiana lutea, afin d'établir si les organes souterrains diffèrent des feuilles par la présence de xanthones ou si l'on y retrouve les C-glucosides flavoniques que nous venons de mettre en évidence dans les feuilles.

Dans les feuilles de Gentiana bavarica (section Cyclostigma), en employant le même procédé d'isolement, nous n'avons, au contraire, identifié que des xanthones substituées en 1,3,7,8, dont 5 hétérosides nouveaux.

Ces dernières substances n'ont jusqu'ici été décelées que dans la famille des Gentianacées : genres Swertia, Macrocarpaea, Canscora et Gentiana (Kochiana et verna). Mais seule l'étude des autres espèces de la section Cyclostigma, voire l'étude d'autres sections, permettra d'établir de nouveaux liens phytochimiques dans le genre Gentiana.

PARTIE EXPERIMENTALE

8. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

8.1. Chromatographie sur papier

Nous avons utilisé du papier Schleicher & Schüll, type 2043 b Mgl. Le développement ascendant a été effectué dans une cuve, saturée de vapeur de solvant, de hauteur = 30 cm et de $\varnothing$ = 15 cm.

La hauteur de migration a été fixée à 20-22 cm.

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des sucres :

n-butanol - pyridine - eau (6:4:3)

acétate d'éthyle - pyridine - eau (2:1:2)

n-butanol - éthanol - eau (35:10:10).

8.2. Chromatographie sur couche mince

8.2.1. Couches minces de polyamide

Les meilleures séparations ont été obtenues avec des plaques de polyamide préparées par nous-même. A cet effet, 8 g de polyamide en suspension dans 45 ml d'éthanol sont versés à l'aide d'un appareil DESAGA, sur 5 plaques de verre de dimensions 20 x 20 cm.

Types de polyamide utilisée :

Macherey-Nagel DC-11

Merck 11

Comme cette dernière polyamide ne contient pas d'indicateur de fluorescence, nous avons ajouté à la suspension, lors de la préparation d'une série de plaques, 0,1 g d'indicateur Riedel-De Haën ZS Super.

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des composés polyphénoliques :

méthanol - eau (8:2)

méthanol - eau (9:1)

méthanol - eau - acide acétique (90:5:5)

benzène - méthanol - acide acétique (45:32:16)

8.2.2. Couches minces de cellulose

Une excellente séparation a été obtenue avec les plaques finies Merck, cellulose F₅₀, épaisseur de la couche 0,10 mm.

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des polyphénols (surtout les C-glucosides flavoniques) :

isobutanol - acide acétique - eau (10:4:7)

acide acétique 5%, 10%, 15%, 30%.

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des sucres :

n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5)

n-butanol - pyridine - eau (6:4:3).

8.2.3. Couches minces de gel de silice

Les plaques ont été préparées par nous-mêmes à l'aide de l'étendeur DESAGA. Pour une série de 5 plaques, on emploie 30 g de gel de silice Merck GF 254 en suspension dans 60 ml d'eau.

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des composés polyphénoliques :

chloroforme - méthanol (95:5)

benzène - pyridine - eau (36:9:5)

acétate d'éthyle - méthanol - eau (100:16,5:13,5).

Pour l'analyse des sucres, le système acétate d'éthyle - méthanol - eau - acide acétique (65:15:15:20) donne de bons résultats.

8.3. Chromatographie sur colonne

Nous avons employé diverses colonnes de diamètres intérieurs variant de 1,5 à 6,5 cm et de hauteurs comprises entre 20 et 120 cm. Elles sont munies d'un dispositif permettant un écoulement variable et à pression constante. Le remplissage des colonnes a toujours été effectué avec le support en suspension dans le solvant d'élution.

Avant l'introduction des substances à séparer (en solution dans le solvant d'élution), les colonnes ont été lavées avec le solvant d'élution jusqu'à la disparition de tout résidu solide dans les eaux de lavage.

La quantité de substance à introduire sur une colonne, ainsi que l'écoulement, dépendent de l'adsorbant et des dimensions de la colonne. A titre d'exemple, nous indiquons les conditions qui ont permis d'obtenir une excellente séparation des différents extraits méthanoliques :

adsorbant : polyamide Macherey-Nagel, SC-6

éluant : méthanol - eau (9:1)

colonne : en verre, hauteur de l'adsorbant :
100 cm, diamètre intérieur : 6,5 cm.

quantité de substance introduite dans la colonne :

8 - 10 g extrait sec mis en solution dans 70 ml d'éluant.

vitesse d'élution : 40 ml/h.

Les systèmes suivants ont également été employés avec succès :

Polyamide Macherey-Nagel SC-6

(grosueur des grains : 0,16 mm): MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5)

C₆H₆-MeOH-AcOH (45:32:16)

Gel de silice 60 Merck

(grosueur des grains : 0,063 - 0,200 mm): CHCl₃-MeOH (95:5)

Cellulose microcristalline Merck : AcOH 15%

Sephadex LH 20 : MeOH

Sephadex G10 : H₂O

Tous les solvants employés ont été préalablement distillés.

9. TECHNIQUES D'ANALYSE

9.1. Spectroscopie UV

Les spectres UV ont été enregistrés avec un appareil UNICAM SP 800, en solution dans le méthanol. La concentration des solutions a été ajustée de façon à obtenir une absorbance maximale comprise entre 0,8 et 1,2. Pour chaque substance, le spectre a été réalisé en présence des réactifs chimiques habituels, selon les indications de MABRY, MARKHAM & THOMAS [23].

9.2. Spectroscopie IR

Les spectres IR ont été enregistrés à partir de disques de KBr contenant 0,3 à 0,5 % de substance cristalline, sur un appareil PERKIN-ELMER, modèle 521. Pour certains hétérosides flavoniques, une meilleure résolution a pu être obtenue par un lavage préalable des cristaux à l'hexane [50].

9.3. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil VARIAN A-60 à 37°C, dans le deutérochloroforme pour les aglycones et les dérivés acétylés, et le deutérodiméthylsulfoxyde pour les glycosides.

9.4. Hydrolyses

9.4.1. O-glycosides et recherche des sucres

Vingt à quarante mg de glycoside, en solution dans 5 - 10 ml de méthanol, sont chauffés à reflux avec 50 ml de HCl 2 N durant 2 à 4 heures. Après refroidissement, l'aglycone est extrait à l'éther ou au n-butanol. La phase aqueuse est utilisée pour la recherche des sucres. Dans ce dessein, nous éliminons l'acide chlorhydrique par neutralisation à l'hydrogénocarbonate de sodium. La solution neutre est ensuite évaporée à sec et les sucres extraits à la pyridine à 60°C. Cette dernière solution est alors appliquée sur papier Schleicher & Schüll, en présence de sucres témoins, et chromatographiée dans différents systèmes de solvants (voir 8.1). Les chromatogrammes ont été révélés avec une solution de phtalate d'aniline (0,93 g d'aniline et 1,66 g d'acide phtalique dissous dans un mélange formé de 90 ml de n-butanol et de 10 ml d'eau) [51].

9.4.2. C-glycosides [37]

Dix mg de substance sont chauffés à reflux pendant 6 heures avec 100 mg de phénol fraîchement distillé et 1 ml d'acide iodhydrique de densité 1,7. Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé dans une solution d'hydrogénosulfite de sodium à 20%. Le précipité brun-rouge formé est filtré, lavé plusieurs fois à l'eau chaude, puis au méthanol à 10%. Ce produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20 avec le méthanol comme éluant.

9.5. Acétylation

L'acétylation des glycosides est effectuée à température ambiante : 30 mg de glycoside, 5 ml d'anhydride acétique fraîchement distillé et 1 ml de pyridine anhydre sont réunis. La suspension passe en solution après agitation durant 15 minutes environ. Après 24 heures, le solvant est évaporé sous vide à 50°C.

Le liquide visqueux résultant est traité à l'eau froide et le précipité est recueilli par filtration, puis il est recristallisé dans l'éthanol.

Pour certains aglycones, il est nécessaire de chauffer le mélange réactionnel à reflux pendant 2 heures.

9.6. Méthylation

Le diazométhane conduit pour les aglycones et les glycosides à des produits complètement méthylés [28]. Il a été préparé à partir de la N-nitroso-4-toluène-sulfo-méthylamide (Fluka purum), selon les indications de DE BOER & BACKER [52]: 5 - 100 mg de substance, en solution dans 10 - 20 ml de méthanol absolu, sont traités avec un excès de solution étherée de diazométhane (10 fois la quantité théorique requise), puis abandonnés dans l'armoire frigorifique à environ 4°C pendant 48 heures. Le mélange réactionnel est encore traité avec un excès de diazométhane (5 fois la quantité théorique requise) et abandonné pendant 24 heures à l'armoire frigorifique, puis 24 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est recristallisé dans le méthanol ou purifié par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20 avec le méthanol comme éluant.

9.7. Purification des produits d'hydrolyse ou de méthylation

Les produits bruts d'hydrolyse ou de méthylation ont été purifiés efficacement par chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20. Après évaporation du solvant, le résidu (10 - 100 mg) est repris dans 2 ml de méthanol et introduit sur une colonne de Sephadex LH 20 (voir également 8.3), de longueur = 18 cm et de diamètre = 2 cm. L'élution est effectuée avec le méthanol à la vitesse de 15 - 20 ml/h. L'éluat est recueilli par fractions de 2 ml à l'aide d'un collecteur automatique de fractions et analysé par CCM de polyamide avec, comme éluant, le mélange MeOH-H₂O-AcOH (90:5:5). Les fractions identiques sont réunies, concentrées et recristallisées dans le méthanol.

Dans certains cas (C-glycosides), nous avons employé le Sephadex G 10 avec l'eau comme solvant d'élution.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. L. Crélerot*, Travail de certificat, Université de Neuchâtel (1971) Non publié.
- [2] R. Hegnauer, "Chemotaxonomie der Pflanzen", vol. IV, p. 176-192; Birkhäuser, Basel (1966)
- [3] E.C. Bate-Smith, J. Linn. Soc. London (Botany) 58, 95 (1962)
- [4] J. B. Harborne, "Comparative Biochemistry of the Flavonoids"; Academic Press, London (1967)
- [5] I. K. Nikitina, Tr. Leningrad Khim.-Farm. Inst. 21, 159, 162 (1967)
- [6] L. Canonica & F. Pelizzoni, Gazz. chim. Ital. 85, 1007 (1955)
J. E. Atkinson, P. Gupta & J.R. Lewis, Tetrahedron 25, 1507 (1969)
- [7] R. Ramos Morgado, An. Fac. Farm. Porto 26, 5 (1966)
- [8] J.E. Atkinson, P. Gupta & J.R. Lewis, Tetrahedron 25, 1507 (1969)
- [] M. Bridel, J. Pharm. Chim. 8, 241 (1913)
- [10] M. Bridel, J. Pharm. Chim. 10, 32 (1914)
- [11] V. Plouvier, J. Massicot & P. Rivaille, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. D 264, 1219 (1967)
- [12] P. Rivaille, J. Massicot, M. Guyot & V. Plouvier, Phytochemistry 8, 1533 (1969)
- [13] M. Guyot, J. Massicot & P. Rivaille, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. C. 267, 423 (1968)
- [14] K. R. Markham, Tetrahedron 21, 3687 (1965)
- [15] P. Rivaille & D. Raulais, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. D 269, 1121 (1969)
- [16] D. J. Ross, New Zeal. J. Sci. Technol. 32B, 39 (1950)

* "Contribution à l'étude phytochimique du genre Gentiana (Tourn.)L., section Cyclostigma Griseb".

- [17] F.Gomez-Carcedo, Farmacognosia (Madrid) 16, 143 (1956)
- [18] G.Franz & H.Meier. Z.Pflanzenphysiol. 66, 433 (1972)
- [19] G.Bellmann, Thèse Université de Neuchâtel (1970)
- [20] K.R.Markham, Tetrahedron 20, 991 (1964)
- [21] J.Massicot, J.P.Marthe & S.Heitz, Bull.Soc.chim.France 1963, 2712
- [22] P.K.Grover & G.D.Shah, J.Chem.Soc. 1955, 3983
- [23] T.J.Mabry, K.R.Markham & M.B.Thomas, "The Systematic Identification of Flavonoids"; Springer, New York (1970)
- [24] F.Wessely & G.H.Moser, Mh.Chemie 56, 97 (1930)
- [25] P.Düll, Thèse Ludwig-Maximilians Universität (1970)
- [26] W.E.Hillis & D.H.S.Horn, Austr.J.Chem. 18, 531 (1965)
- [27] B.Gentili & R.M.Horowitz, J.Org.Chem. 33, 1571 (1968)
- [28] L.Rosprim, Thèse Ludwig-Maximilians Universität (1966)
- [29] C.A.Williams & B.G.Murray, Phytochemistry 11, 2507 (1972)
- [30] V.I.Litvinenko & B.N.Aronova, Khim.Prir.Soedin. 3, 159 (1968)
V.I.Litvinenko & P.E.Krivenchuk, Farm.Zh.(Kiev) 23, 62 (1968)
- [31] R.Scharfetter, "Biographie von Pflanzensippen", p.315-331;
Springer, Wien (1953)
- [32] A.Girard, C.r.hebd.Séances Acad.Sci. 73, 426 (1871)
S.J.Angyal, P.T.Gilham & C.G.Macdonald,
J.Chem.Soc. 1957, 1417
V.Plouvier, C.r.hebd.Séances Acad.Sci. 253, 3047 (1961)
V.Plouvier, C.r.hebd.Séances Acad.Sci. 260, 1003 (1965)
S.Nishibe, S.Hisada & I.Inagaki, Phytochemistry
10, 896, 2543 (1971)
- [33] F.E.King & L.Jurd, J.Chem.Soc. 1953, 1192
- [34] M.Seikel, J.H.S.Chow & L.Feldman, Phytochemistry 5, 439 (1966)
- [35] B.H.Koeppen & J.E.van der Spuy, Biochem.J. 83, 507 (1962)
- [36] H.Wagner, L.Rosprim & P.Düll, Z.Naturforsch. 27b, 954 (1972)

- [37] S.Iseda, Bull.chem.Soc.Japan 30, 625 (1957)
- [38] R.E.Alston, "Recent Advances in Phytochemistry", p.305-327;
J.B.Harborne, ed. (1967)
- [39] G.G.De Oliviera, A.A.Lins Mesquita, D.R.Gottlieb &
M.T.Magalhaes, Anal.Chim.Acta 42, 311 (1968)
- [40] B.Jackson, H.D.Lockesley & F.Scheinmann, J.Chem.Soc.
1966, 178
- [41] R.C.Roberts, Chem.Reviews 61, 592 (1961)
- [42] G.H.Stout, B.J.Reid & G.D.Breck, Phytochemistry 8, 2417 (1969)
- [43] S.R.Dalal & R.C.Shah, J.Ind.chem.Soc. 30, 453 (1953)
R.C.Shah, S.R.Dalal & A.B.Kulkarni, J.Sci.Ind.Res.
13B, 175 (1954)
- [44] R.K.Chaudhuri & S.Ghosal, Phytochemistry 10, 2425 (1971)
- [45] M.Komatsu, T.Tomimori & N.Mikuriya, Chem.Pharm.Bull.
17, 155 (1969)
- [46] P.Laszlo, in "Progress in Nuclear Magnetic Resonance
Spectroscopy", vol.3, p.288; Pergamon Press,
New York (1967)
- [47] H.Rösler, T.J.Mabry, M.F.Cranmer & J.Kagan,
J.Org.Chem. 30, 4346 (1965)
- [48] J.B.Harborne, "Biochemistry of Phenolic Compounds", p.133;
J.B.Harborne, ed.; Academic Press, New York (1964)
- [49] H.Wagner, W.Budweg, M.A.Iyengar, O.Volk & M.Sinn,
Z.Naturforsch. 27b, 809 (1972)
- [50] G.Székel, communication personnelle
- [51] S.M.Partridge, Nature 164, 443 (1949)
- [52] Th.J.De Boer & H.J.Backer, "Organic Syntheses", IV, p.250;
J.Wiley & Sons, New York (1963)

